

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular



**ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS MICRORNAS EN LA
DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE CÉLULAS B Y EL
ESTABLECIMIENTO DE LA TOLERANCIA
INMUNOLÓGICA**

Tesis Doctoral

Laura Belver Miguel

Madrid, 2011

Memoria presentada por Laura Belver Miguel, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Hipermutación de ADN y Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección de la Doctora Almudena R. Ramiro.

Índice

Abstract.....	3
Introducción	7
PARTE I: Diferenciación y función de células B	9
Sistema inmune e inmunidad adaptativa	9
Diferenciación de células B y diversificación de anticuerpos	10
Señalización a través del BCR: regulación de la diferenciación y función de células B...	16
Autoinmunidad	20
PARTE II: MicroRNAs y respuesta inmune	23
Biogénesis y función de los microRNAs.....	23
MicroRNAs e inmunidad adaptativa.....	24
miRNAs y autoinmunidad	27
Objetivos	29
Resultados.....	33
Parte I: Análisis fenotípico de la población B	35
Diferenciación temprana de células B en médula ósea	35
Células B en tejidos linfoides periféricos.....	37
Subpoblaciones de células B en bazo.....	40
Ensayos de competición en quimeras de médula ósea	43
Parte II: Identificación de miRNAs implicados en la diferenciación terminal de células B	48
Patrones de expresión de miRNAs en células B foliculares y de zona marginal	48
Dianas de miRNAs en genes implicados en diferenciación terminal de células B	49
Expresión de miR185 durante la diferenciación terminal de células B	51
Parte III: Regulación de la señalización a través del BCR por Btk y miR185	52
miR185 reduce los niveles de expresión de Btk	52
Expresión de Btk en células B deficientes para Dicer	53
Señalización a través del BCR en células B deficientes para Dicer	55
La sobreexpresión de Btk reproduce el fenotipo de las células deficientes para Dicer...	57
Parte IV: Repertorio de IgH, autoanticuerpos y autoinmunidad	59
Repertorio de anticuerpos	59
Anticuerpos autorreactivos	62
Formación de inmunocomplejos en los glomérulos renales	64
Patología renal.....	65

Discusión	67
Deleción de Dicer en animales CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/fl}	69
Subpoblaciones de células B en ratones CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/fl}	70
Dependencia de los miRNAs de células B foliculares	71
Regulación de Btk por miR185.....	72
Repertorio de anticuerpos y autorreactividad	74
Autoinmunidad.....	76
Consideraciones finales.....	77
Conclusiones.....	79
Materiales y métodos	83
Análisis fenotípico de ratones CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/fl}	85
Reconstitución hematopoyética por transplante de médula ósea	87
Análisis de la expresión de miRNAs en subtipos de células B.....	88
Cultivos celulares.....	89
Transducción retroviral de células B primarias	90
Análisis de la expresión génica	92
Ensayos de activación de células B a través del BCR	94
Ensayos de ganancia y pérdida de función de Btk.....	96
Repertorio de anticuerpos	96
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	97
Análisis histológicos	98
Análisis estadísticos	99
Bibliografía	101
Anexo	111
Publicaciones.....	113

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally and have been demonstrated to control several biological processes including immune regulation. The endonuclease Dicer is essential for the generation of mature miRNAs. To address the role of miRNAs in terminal B cell differentiation we generated CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mice where Dicer is specifically ablated in B cells.

Early B cell differentiation was completely normal in CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mice but instead these animals showed a global reduction of B cell numbers in the peripheral lymphoid tissues. We found that in the absence of Dicer the transitional and marginal zone B cell compartments were overrepresented, and follicular B cell generation was impaired. By analyzing miRNA expression profile of follicular and marginal zone wild type cells we found 31 miRNAs that were differentially expressed. All of them were upregulated in the follicular compartment suggesting that miRNA expression is more critical for follicular than marginal zone differentiation. We found that one such miRNA, miR185, could target Bruton's tyrosine kinase (Btk), a protein involved in BCR signalling. Indeed, Btk levels were increased in CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} cells, which resulted in an enhanced signalling response through the BCR. Finally, we analyzed the antibody repertoire in these animals and observed an increased proportion of positive charges within the CDR3, that are characteristic of autoreactivity. When testing aged mice sera for the reactivity against autoantigens, we found that CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} females showed high titers of autoreactive antibodies. These autoantibodies accumulated in the kidney forming immunocomplexes and resulting in renal damage.

In summary, our results show that miRNA-based regulation is essential for a correct terminal B cell differentiation and activation. These data suggest that the upregulation of Btk due to the absence of miR185 is responsible for an abnormal BCR signalling that results in a biased terminal B cell differentiation and compromises B cell tolerance in CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mice. These results reveal a novel function for miRNA-mediated regulation of gene expression that can be essential to the understanding of autoimmune diseases.

Introducción

PARTE I: Diferenciación y función de células B

Sistema inmune e inmunidad adaptativa

La aparición del sistema inmune en la naturaleza responde a la necesidad de los organismos de defenderse frente al posible ataque de agentes externos. A lo largo de la evolución los mecanismos que confieren esta protección han adquirido una complejidad creciente gracias al establecimiento de sofisticadas redes de interacción que coordinan la respuesta conjunta de distintas células, tejidos y sistemas.

El desarrollo de una respuesta inmune requiere el reconocimiento de un factor como potencialmente patogénico y la activación de distintas funciones efectoras que permitan la eliminación del mismo. En función de sus características, en animales vertebrados se pueden distinguir dos tipos de respuesta inmune: innata y adaptativa. Aunque los mecanismos y funciones de cada una de ellas son diferentes, ambas se complementan y regulan mutuamente para optimizar la protección del organismo contra infecciones. En la respuesta innata la detección de un agente infeccioso se basa en el reconocimiento de patrones moleculares que son comunes para una amplia variedad de patógenos. Este sistema permite el bloqueo de ciertas infecciones de una forma eficiente pero poco específica y a través de mecanismos similares independientemente de la naturaleza o la recurrencia del patógeno. Por el contrario, en la respuesta inmune adaptativa el reconocimiento y las acciones efectoras subsecuentes son altamente específicos del patógeno particular que inició la respuesta y además permite el desarrollo de la memoria inmunológica, que es capaz de recordar al patógeno eliminado haciendo que la respuesta sea más rápida y eficaz en caso de producirse una segunda infección por el mismo.

Las células efectoras de la inmunidad adaptativa son los linfocitos o células T y B. Las células T proporcionan inmunidad celular frente a patógenos intracelulares y colaboran en la activación de otras células del sistema inmune, mientras que las células B están especializadas en el desarrollo de respuestas humorales contra patógenos extracelulares. La actividad de ambos tipos celulares se basa en la expresión de receptores para el antígeno, llamados TCRs (del inglés, *T Cell Receptor*) en células T y BCRs (del inglés, *B Cell Receptor*) en células B, capaces de reconocer una estructura molecular concreta (antígeno) que podría potencialmente estar

presente en un patógeno. Cada célula particular tiene una especificidad exclusiva para detectar un único antígeno, pero el conjunto de todas ellas da lugar a un amplio repertorio de receptores diferentes con habilidad para detectar y combatir cualquier infección a la que el organismo pueda verse expuesto.

Diferenciación de células B y diversificación de anticuerpos

Recombinación V(D)J: Repertorio primario de anticuerpos

El proceso de diferenciación de las células B conduce en último término a la expresión de un BCR funcional. El BCR es un complejo multiproteico compuesto por una inmunoglobulina unida a la membrana celular, responsable del reconocimiento antigénico, asociada a un heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$, que constituye la unidad de transducción de señales. La señalización a través del BCR será responsable de la regulación de numerosos aspectos de la fisiología de las células B.

Además de formar parte del BCR, las inmunoglobulinas pueden ser secretadas a la sangre o la linfa, pasando entonces a llamarse anticuerpos. Las inmunoglobulinas o anticuerpos están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos y unidas por enlaces disulfuro, que reciben el nombre de cadenas ligeras (IgL, del inglés, *Immunoglobulin Light chain*) y pesadas (IgH, del inglés, *Immunoglobulin Heavy chain*) respectivamente. Ambos tipos presentan una región variable en el extremo amino y otra constante en el carboxilo. Las regiones variables son responsables del reconocimiento del antígeno, mientras que la región constante de IgH es responsable del isotipo del anticuerpo, que determina el mecanismo por el que el antígeno va a ser procesado para su eliminación (**Fig. 1**).

La diferenciación de las células B ocurre en la médula ósea y permite la generación de un repertorio primario de anticuerpos de una enorme variabilidad. La diversidad de estos receptores se consigue mediante un mecanismo denominado recombinación V(D)J, homólogo al que genera el repertorio de TCRs en células T (Jung and Alt, 2004). El sistema se basa en el reordenamiento somático de los genes de IgL e IgH (**Fig. 1**). En estos genes la parte que codifica para la región variable está formada por un gran número de segmentos que se distribuyen en tres grupos: V (Variable), D (Diversidad) y J (Unión, del inglés, Joining) (Early et al., 1980; Schilling et al., 1980; Valbuena et al., 1978; Weigert et al., 1978). IgL cuenta únicamente con

segmentos V_L y J_L mientras que IgH presenta segmentos de los tres grupos (V_H , D_H y J_H). La recombinación es iniciada por una recombinasa específica de linfocitos compuesta por las proteínas RAG1 y RAG2 (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989). Todos los segmentos V, D y J se encuentran flanqueados por unas secuencias conservadas llamadas RSSs (del inglés, *Recombination Signal Sequence*) (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979). Durante la recombinación V(D)J, RAG1 y RAG2 se unen a estas RSSs y producen cortes en el DNA que se resuelven modificando la secuencia del locus original. El resultado de este proceso es la fusión de un segmento de cada grupo formando combinaciones V_L-J_L y $V_H-D_H-J_H$ en los loci de IgL e IgH respectivamente (Fig. 1).

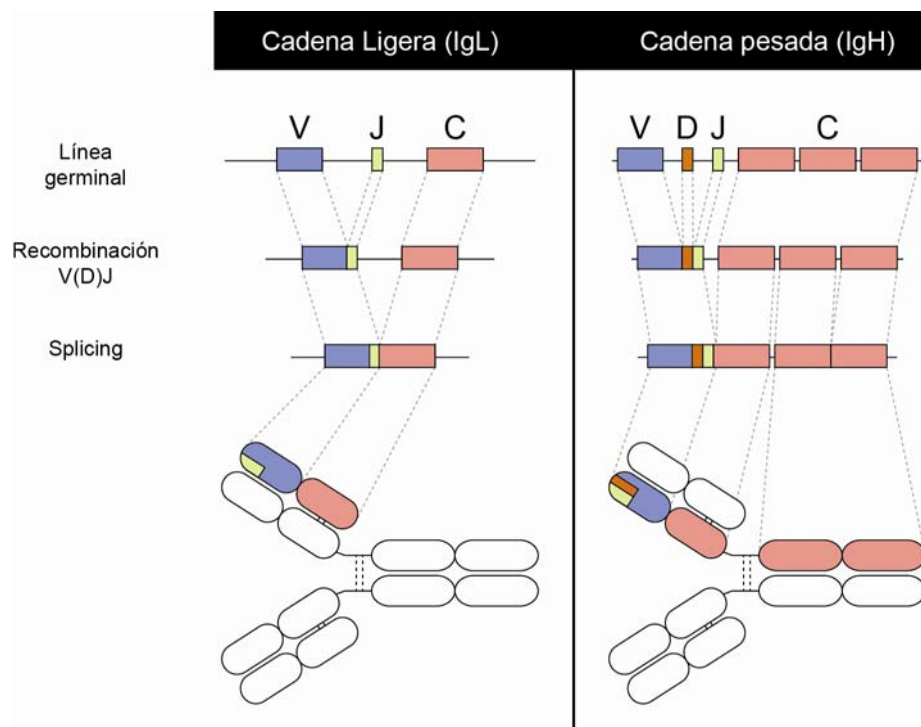


Figura 1 - Estructura de inmunoglobulinas y recombinación V(D)J

Las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas unidas, iguales dos a dos, que reciben el nombre de cadenas ligeras o IgL (panel izquierdo) y cadenas pesadas o IgH (panel derecho). Cada una de ellas presenta una región constante y una región variable, que será responsable del reconocimiento antigénico. La porción variable de IgL (V_L) se construye mediante la combinación de dos segmentos génicos llamados V (representado de color azul) y J (representado de color amarillo). El DNA que codifica para estos dos segmentos se une para formar un solo exón mediante el mecanismo de recombinación V(D)J. La porción constante de IgL (C_L , representada en rojo) está codificada en un exón independiente que se une al exón de V_L mediante *splicing* del transcrito. Por su parte, la región variable de IgH (V_H) está compuesta por tres segmentos génicos: V (azul), D (naranja) y J (amarillo). Del mismo modo que para IgL, la recombinación V(D)J permite unir estos tres segmentos formando un solo exón que codifica V_H . La región constante de IgH (C_H) está compuesta de varios exones que se unen entre sí y al exón de V_H por *splicing* del RNA mensajero.

La elección de los segmentos que van a participar en el reordenamiento ocurre esencialmente al azar y es responsable de la enorme variedad de receptores resultante, producto de todas las posibles combinaciones de los distintos segmentos. Además el proceso de recombinación no es preciso, sino que implica la escisión, duplicación e inserción de nucleótidos en las regiones de unión entre segmentos V-D y D-J, lo que aumenta aún más la variabilidad obtenida por la simple combinación de los mismos (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979; Seidman et al., 1979). La variabilidad combinatoria V(D)J de IgH e IgL junto con las imprecisiones en las uniones puede generar un repertorio de anticuerpos de diversidad virtualmente ilimitada - se ha estimado que en humanos el número de combinaciones posibles es 10^{14} -, que permitirá el reconocimiento de cualquier antígeno presente en la naturaleza. El reconocimiento antigénico se producirá fundamentalmente gracias a tres regiones hipervariables llamadas CDR1/2/3 (del inglés, *Complementary Determining Region*). Las regiones CDR1 y CDR2 se encuentran codificadas en el segmento V mientras que la CDR3, presente únicamente en IgH, incluye el segmento D y las uniones V_H-D_H y D_H-J_H. Esto hace que CDR3 sea la región con mayor variabilidad del anticuerpo y, por tanto, la más determinante de la especificidad antigénica (Xu and Davis, 2000).

Diferenciación temprana de células B: desarrollo en médula ósea

Las células B se generan en la médula ósea mediante un complejo programa de diferenciación a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotentes. Cuando uno de estos precursores inicia el programa de diferenciación del linaje B comienza un proceso secuencial con una serie de etapas que culminan con la generación de una célula B inmadura capaz de expresar en su membrana un BCR funcional. Cada uno de los estadios intermedios de desarrollo implica unos patrones de expresión génica particulares que controlan los procesos celulares necesarios en cada fase de la diferenciación y permiten su caracterización fenotípica (Hardy and Hayakawa, 2001) (Fig. 2).

A nivel funcional, la característica fundamental que distingue las etapas de diferenciación es el estado de reordenamiento de los *loci* de IgH e IgL (Hardy et al., 1991). Los primeros precursores del linaje B son las células preproB, pero es en el estadio proB cuando comienza la recombinación V(D)J con el reordenamiento de IgH. Cuando este proceso se ha completado, la célula pasa al estadio preB donde la cadena IgH recombinada será expresada en la membrana junto con una cadena ligera

invariable llamada SLC (del inglés, *Surrogate Light Chain*) (Karasuyama et al., 1990; Tsubata and Reth, 1990) y las subunidades de transducción de señales Ig α e Ig β . Juntas conforman un receptor llamado pre-BCR y que desencadena la expansión clonal de las células preB y a continuación el inicio de la recombinación de IgL. Las células que concluyan con éxito este proceso alcanzarán el estadio de células B inmaduras en el que tiene lugar la expresión en la membrana de un BCR funcional producto de la combinación de las cadenas IgH e IgL reordenadas (Fig. 2).

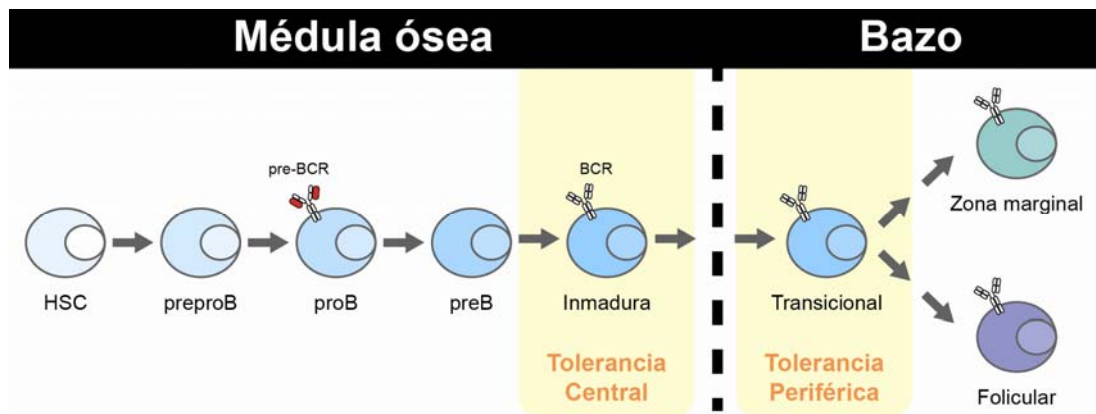


Figura 2 - Diferenciación de células B

Las células B comienzan su diferenciación en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*). Para ello tienen que atravesar una serie de etapas que conducen a la generación de células B inmaduras. El evento más importante durante esta etapa del desarrollo en médula ósea es la recombinación V(D)J. Este proceso tiene lugar durante los estadios proB y preB y consiste en el reordenamiento somático de los genes que codifican para el BCR, lo que permite la generación de un repertorio de anticuerpos enormemente variable con potencial para reconocer cualquier antígeno. Cada célula B inmadura expresará un BCR con una especificidad antigénica concreta.

La célula B inmadura migra al bazo, donde pasa a denominarse célula B transicional. En ese estadio tiene lugar la toma de decisión del destino celular final, que puede generar dos poblaciones B: células de zona marginal o foliculares. Aunque ambos subtipos son ya células B maduras, son funcionalmente distintos y cada uno de ellos está especializado en un tipo de respuesta concreto.

El proceso de recombinación V(D)J en médula ósea ocurre al azar y por tanto es posible la generación de anticuerpos que reconozcan antígenos propios. Para prevenir esto, existen dos puntos de control o *checkpoints* de tolerancia en los que las células que portan BCR autorreactivos son forzadas a revisar su receptor (edición), eliminadas (delección) o pierden su capacidad de respuesta (anergia). Esta selección ocurre en dos momentos durante la diferenciación: en células B inmaduras (*checkpoint* de tolerancia central) y en células transicionales (*checkpoint* de tolerancia periférica).

Diferenciación tardía de células B: poblaciones periféricas de células B

Las células B inmaduras abandonan la médula ósea portando en su membrana una inmunoglobulina del isotipo IgM, pero una vez en la periferia pueden expresar también por *splicing* alternativo el isotipo IgD. Las células inmaduras periféricas pasan a denominarse células transicionales y a partir de ellas tiene lugar el último paso del programa de diferenciación B que genera dos subtipos celulares funcionalmente diferentes: las células foliculares y las células de zona marginal. Estas dos subpoblaciones ya son células B maduras con capacidad de llevar a cabo una respuesta inmune, siendo ambas necesarias para conferir una protección eficiente frente a infecciones (Allman and Pillai, 2008; Carsetti et al., 2004) (**Fig. 2**).

Los compartimentos folicular y de zona marginal presentan una localización anatómica particular dentro del bazo que responde a una especialización funcional de cada subtipo celular ligada al nicho en el que se encuentra. Las células de zona marginal se sitúan en la región más externa de la pulpa blanca esplénica, entre el seno marginal y la pulpa roja. Estas células constituyen una primera línea defensiva de respuesta rápida frente a patógenos presentes en la sangre, por ello su disposición en el bazo facilita su función (Martin et al., 2001). Por su parte, las células B foliculares se encuentran localizadas en el interior de los folículos, en contacto con la región de células T de la pulpa blanca y aisladas del contacto directo con la sangre. La población folicular está especializada en llevar a cabo respuestas T-dependientes y su distribución anatómica favorece la interacción con las células T (Martin and Kearney, 2002; Oliver et al., 1999). Además las células foliculares son capaces de recircular a otros órganos linfoides secundarios y colonizar la médula ósea, donde también pueden responder a patógenos sanguíneos de forma T-independiente (Cariappa et al., 2007; Cariappa et al., 2005).

Existe un tercer subtipo de células B, llamado B1. Estas células son de origen fetal y se mantienen por autorrenovación en individuos adultos (Martin and Kearney, 2001). Se encuentran fundamentalmente en las cavidades peritoneal y pleural, pero es posible encontrar una pequeña proporción de las mismas en el bazo. Al igual que las células de zona marginal, las B1 se caracterizan por contribuir en respuestas T-independientes (Allman and Pillai, 2008; Martin et al., 2001) y ambos subtipos han sido relacionados con la generación de anticuerpos autorreactivos (Allman and Pillai, 2008; Dammers et al., 2000; Hayakawa et al., 1984; Li et al., 2002; Martin and Kearney, 2000).

Reacción del centro germinal: repertorio secundario de anticuerpos

El reconocimiento antigénico a través del BCR permite la activación de la célula B en el contexto de un linfocito T y desencadena la reacción de centro germinal. En los centros germinales las células B tienen una segunda oportunidad mejorar su repertorio de anticuerpos, a través de dos procesos independientes: la hipermutación somática y la recombinación de cambio de isotipo. Ambas reacciones están iniciadas por una misma enzima, AID (del inglés, *Activation Induced Deaminase*) (Muramatsu et al., 2000; Muramatsu et al., 1999).

La hipermutación somática introduce mutaciones puntuales en la secuencia de la región variable, responsable del reconocimiento antigénico, de los genes de IgH e IgL. Si estas mutaciones dan lugar a un anticuerpo con una mayor afinidad por el antígeno que produjo la activación son seleccionadas. Por el contrario, si la eficiencia en el reconocimiento del antígeno disminuye, la célula que produce dicho anticuerpo entra en apoptosis. Este proceso recibe el nombre de maduración por afinidad y resulta en un aumento de la afinidad del anticuerpo por el antígeno (Maul and Gearhart, 2010).

Por su parte, el cambio de isotipo se lleva a cabo por recombinación somática específica de región. En este caso las regiones constantes C μ y C δ de IgH, que generan los isotipos IgM e IgD respectivamente, son reemplazadas por C γ , C ϵ o C α , situadas en el extremo 3' del locus, dando lugar a los isotipos IgG, IgE e IgA. Este intercambio se produce por recombinación entre las regiones de *switch*, que son regiones no codificantes que preceden a cada uno de los genes que codifican para las cadenas constantes. La reacción de cambio de isotipo permite así que una misma región variable se combine con distintas cadenas constantes, cada una con unas funciones efectoras diferentes. De esta forma las células B son capaces de crear anticuerpos con una eficiencia mayor en la respuesta frente al antígeno en función de la naturaleza del mismo (Stavnezer et al., 2008).

El resultado final de la reacción de centro germinal es la generación de células B plasmáticas y células B memoria. Las primeras serán capaces de secretar anticuerpo que podrá unirse y neutralizar al patógeno que desencadenó la respuesta mediante la activación del complemento o fagocitosis. Las células B memoria por su parte permanecerán en el organismo en un estado de latencia durante largos periodos de tiempo y, en caso de que se repita la infección por el mismo patógeno, se activarán consiguiendo que la respuesta sea más rápida y eficaz que en la primera

exposición (Goodnow et al., 2010).

Un caso particularmente interesante en la diversificación de anticuerpos es el del tejido linfóide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, del inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), debido a su continua exposición a antígenos y la influencia que ello tiene sobre el sistema inmune de todo el organismo. Este tejido regula el desarrollo de las respuestas dependientes de IgA, que constituyen un elemento fundamental de la inmunidad humoral. En el intestino delgado, el GALT está representado por las placas de Peyer, que son las principales responsables de la formación de células productoras de IgA. El desarrollo de estas células implica la inducción de la reacción de cambio de isotipo y va ligada a la formación constitutiva de centros germinales y secreción de IgA en las placas de Peyer, lo que establece una barrera de protección frente a antígenos microbianos en la mucosa intestinal (Fagarasan and Honjo, 2003).

Señalización a través del BCR: regulación de la diferenciación y función de células B

Transducción de señales a través del BCR

El BCR juega un papel fundamental en la diferenciación, supervivencia y activación de la célula B. La unión del BCR con un antígeno puede dar lugar a una gran versatilidad de respuestas, promoviendo anergia, apoptosis, proliferación o diferenciación de la célula B en función del estadio del desarrollo y de los estímulos presentes (Niir and Clark, 2002). La propia supervivencia de las células B maduras no activadas es dependiente de niveles basales de señalización a través del BCR (señal tónica) (Monroe, 2006).

La cascada de señalización a través del BCR se inicia por la unión de la inmunoglobulina con el antígeno, lo que promueve la fosforilación de las regiones ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) de los dominios citoplásmicos de Ig α /Ig β y la activación de tres quinasas: Syk, Lyn y Btk (Fig. 3). A continuación, los adaptadores BLNK y BAM32 modulan la progresión de la vía mediante la conexión de estas quinasas con distintas moléculas efectoras. De este modo, la activación de PI3K resultará en la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (IP₃) , que a su vez activa otras quinasas como AKT. Por otro lado, la

fosforilación de PLC γ 2 induce la liberación de Ca $^{2+}$ y la activación de PKC, ambos esenciales para la fosforilación de quinasas de la familia MAPK, como ERK, c-JUN, JNK y p38, y de factores de transcripción, como NF κ B y NFAT (Fig. 3). La activación diferencial de estas vías de señalización es responsable de las distintas funciones biológicas que pueden potencialmente ser moduladas por el BCR, si bien los mecanismos que regulan la activación particular de cada una de ellas no se conocen con detalle (Niiró and Clark, 2002).

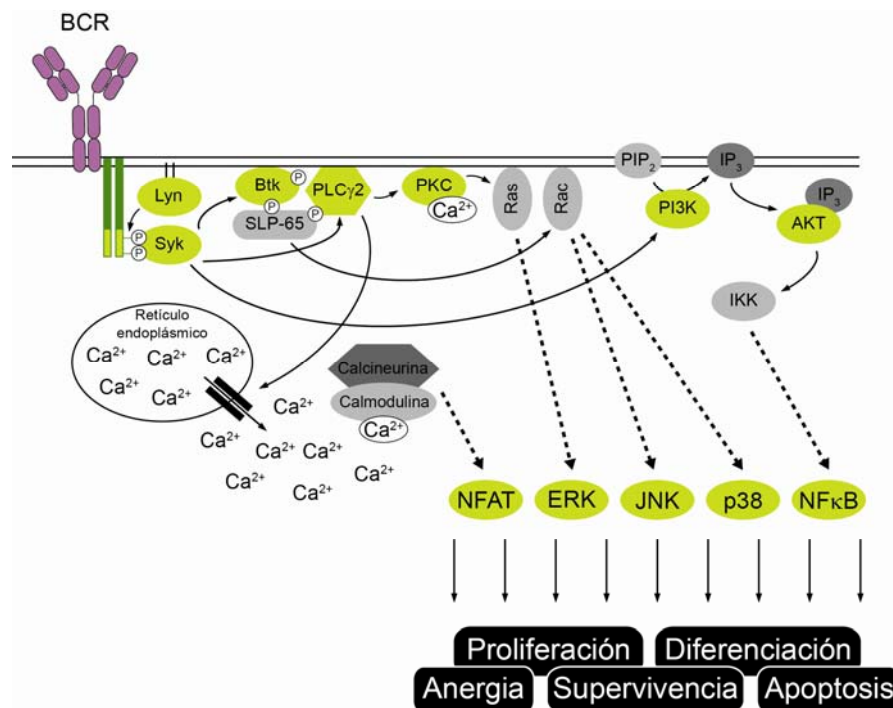


Figura 3 - Señalización a través del BCR

La unión del antígeno al BCR conlleva la activación de tres quinasas: Syk, Lyn y Btk, que son capaces de producir la fosforilación de distintos sustratos activando de este modo distintas vías de señalización. PI3K produce IP $_3$ que es capaz de reclutar a AKT, activando la vía de NF κ B. La fosforilación de PLC γ 2 induce la liberación de calcio por el retículo endoplásmico lo que produce la activación del factor de transcripción NFAT y de PKC y Ras, que a su vez conducen a la activación de ERK. PLC γ 2 puede también activar Rac a través de SLP-65, lo que produce la activación de JNK y p38. Estas vías de señalización son capaces de determinar el destino de la célula B mediante el control de funciones biológicas muy variadas, pero los mecanismos por los que el BCR es capaz de modular procesos tan diversos no se conocen en profundidad.

Regulación de la diferenciación terminal de células B por el BCR

La decisión del destino celular entre las poblaciones de zona marginal y folicular y su homeostasis está reguladas por el BCR y presumiblemente depende de la intensidad de esta señalización (Carsetti et al., 2004; Pillai and Cariappa, 2009). Numerosos estudios han demostrado que la expresión alterada de componentes que participan en esta cascada de señalización es suficiente para modificar el destino final de las células transicionales (Niiró and Clark, 2002). Estas alteraciones resultan en proporciones anormales de las poblaciones folicular y de zona marginal que pueden tener implicaciones sobre el correcto desarrollo de la respuesta inmune.

Diversos estudios defienden que una señalización intensa a través del BCR favorece la generación de células de zona marginal en detrimento del compartimento folicular (Samardzic et al., 2002; Wen et al., 2005). Esto parece ir ligado al hecho de que los BCRs autorreactivos, en los que la señalización es más fuerte, se reclutan preferencialmente al compartimento de zona marginal (Li et al., 2002; Martin and Kearney, 2000). Conforme a esta idea, se ha descrito que algunos componentes de la cascada del BCR favorecen la diferenciación de la población de zona marginal. Uno de ellos es la quinasa Btk que participa en el establecimiento de los umbrales de activación de la vía (Khan et al., 1995; Martin and Kearney, 2000; Ng et al., 2004; Satterthwaite et al., 1997). Se ha demostrado que cambios sutiles en la expresión o actividad de Btk alteran la generación de los distintos subtipos de células B (Dingjan et al., 1998; Maas et al., 1999).

Tolerancia inmunológica

El requisito esencial para que la respuesta inmune humoral sea eficiente es la generación de un repertorio de anticuerpos que sea extremadamente diverso y específico. Como ya se ha comentado, la diversidad se consigue en el transcurso de la diferenciación en médula ósea a través del mecanismo de recombinación V(D)J. Posteriormente, tras el encuentro de la célula B con el antígeno en la periferia, la especificidad del anticuerpo es mejorada gracias a la hipermutación somática. Sin embargo, debido a la naturaleza estocástica de ambos procesos, éstos pueden dar lugar a anticuerpos que reconocen antígenos propios (Rajewsky, 1996). Para impedir el desarrollo de reacciones autoinmunes mediadas por estos autoanticuerpos, existen al menos dos *checkpoints* de tolerancia en los que las células B que presentan BCRs autoreactivos son seleccionadas negativamente.

Tolerancia central

En individuos sanos, aproximadamente el 75% de los BCRs generados a través de la recombinación V(D)J en la médula ósea reconocen antígenos propios (Wardemann et al., 2003). Estos receptores autorreactivos se caracterizan por presentar regiones CDR3 largas y cargadas positivamente (Barbas et al., 1995; Crouzier et al., 1995; Ichiyoshi and Casali, 1994; Klonowski et al., 1999; Wardemann et al., 2003) y muchos de ellos son capaces de reconocer más de un autoantígeno (polirreactivos o multiespecíficos). Una gran parte de las células B que expresan estos anticuerpos autorreactivos son neutralizadas en la médula ósea a través del denominado *checkpoint* de tolerancia central, que puede tener lugar a través de tres mecanismos alternativos: delección, edición y anergia. Todos ellos están controlados por los niveles de señalización a través del BCR, de forma que una señal fuerte a través del receptor induce la delección por apoptosis de la célula que lo presenta. Por el contrario señales con intensidades intermedias promueven recombinaciones secundarias, principalmente del locus de IgL, que dan la oportunidad a la célula de editar su BCR con el fin de disminuir su autorreactividad (Gay et al., 1993; Radic et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Finalmente, las células que reconocen autoantígenos pueden también entrar en anergia, un estado en el que pierden su habilidad de iniciar una respuesta inmune (Erikson et al., 1991; Goodnow et al., 1988; Hannum et al., 1996; Nemazee and Burki, 1989). Se estima que entre el 20 y el 50% de las células B transicionales que se encuentran en periferia han sufrido procesos de edición de su receptor, mientras que la contribución de los mecanismos de delección y anergia en el silenciamiento de BCRs autorreactivos es más importante (Casellas et al., 2001; Halverson et al., 2004; Oberdoerffer et al., 2003; Retter and Nemazee, 1998).

Tolerancia periférica

A pesar de la eliminación eficiente de un gran número de células B autorreactivas en la médula ósea, algunas de ellas escapan del *checkpoint* de tolerancia central y migran a la periferia pasando a formar parte de la población de células transicionales (Wardemann et al., 2003). Sin embargo, en la última etapa del proceso de diferenciación existe un segundo punto de control llamado *checkpoint* de tolerancia periférica que permite la eliminación de células que portan receptores autorreactivos antes de que alcancen el estadio de célula B madura (Wardemann et al., 2003). El *checkpoint* de tolerancia periférica tiene lugar en células B

transicionales durante las últimas etapas de la diferenciación y, aunque los mecanismos que lo rigen no se conocen en profundidad, este proceso está presumiblemente regulado por la señalización a través del BCR y acoplado a la toma de decisión del destino celular entre los linajes de zona marginal y folicular (Martin and Kearney, 2000; Wardemann et al., 2003).

En condiciones normales, los dos *checkpoints* de tolerancia (central y periférica) son suficientes para asegurar la generación de un repertorio de anticuerpos que no presente reactividad frente a antígenos del propio organismo, previniendo de este modo el desarrollo de respuestas autoinmunes potencialmente patológicas.

Autoinmunidad

Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes son situaciones patológicas en las que el organismo es atacado por su propio sistema inmune. Las causas que desencadenan estos procesos pueden ser variadas, incluyendo factores ambientales como la exposición a ciertos patógenos o agentes tóxicos (Rose, 1998), pero en último término son producto de deficiencias en los mecanismos que confieren la tolerancia inmunológica. En la actualidad hay identificados unos 80 desórdenes autoinmunes diferentes que presentan una enorme variabilidad en cuanto a su incidencia, los tejidos que resultan atacados, su pronóstico, penetrancia y la prevalencia de género. En países desarrollados las enfermedades autoinmunes afectan entorno a un 3-5% de la población y son responsables de un tercio de las muertes prematuras (Cooper and Stroehla, 2003).

Una de las enfermedades autoinmunes mejor estudiadas es el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE, del inglés, *Systemic Lupus Erythematosus*). SLE es una enfermedad sistémica que puede afectar a la piel, las articulaciones, los riñones, los pulmones, el corazón y el tracto intestinal. En los pacientes se SLE es característica la presencia de autoanticuerpos que reconocen antígenos nucleares, fundamentalmente DNA y ribonucleoproteínas, y componentes de la membrana celular y citoplásmicos, como fosfolípidos. Estos autoanticuerpos forman inmunocomplejos que se acumulan primero en la sangre y posteriormente en distintos órganos, especialmente en el riñón, donde producen una respuesta

inflamatoria que puede resultar en daño tisular. El estudio de las células B de pacientes con SLE ha demostrado que éstas muestran unos niveles de activación anormalmente elevados y son más sensibles a la acción de citoquinas (Mok and Lau, 2003). Además, en la actualidad existen terapias basadas en la inmunodepleción de células B en pacientes con SLE que son capaces de mejorar los síntomas (Dorner and Burmester, 2008), lo que indica que las células B presentan funciones efectoras e inmunoregulatoras responsables de la inducción y mantenimiento de la autoinmunidad sistémica en SLE.

Papel de las células B en las enfermedades autoinmunes

En el caso de las células B, los defectos en el establecimiento de la tolerancia inmunológica propician el mantenimiento en el repertorio de BCRs con especificidad por antígenos propios. En la sangre de pacientes con desórdenes autoinmunes es frecuente encontrar títulos altos de anticuerpos autorreactivos, pero durante mucho tiempo se ha cuestionado si su aparición era suficiente para el desarrollo de la patología. Se ha demostrado que la presencia de autoanticuerpos en sí misma es capaz de iniciar una respuesta inmune contra el propio organismo que puede cursar con activación de células mastoides, del sistema del complemento o con la formación de inmunocomplejos autoanticuerpo-autoantígeno que son capaces de activar a las células B autorreactivas (Ji et al., 2001; Korganow et al., 1999; Kouskoff et al., 1996; Leadbetter et al., 2003; Lee et al., 2002; Maccioni et al., 2002). Sin embargo, otros datos indican que la deficiencia en la tolerancia inmunológica puede preceder a la aparición de la patología *per se* y plantean la existencia de posibles funciones alternativas de las células B en el desarrollo de la misma (Isenberg and Rahman, 2006; van Gaalen et al., 2004). En este sentido, se ha demostrado en un modelo murino de SLE (MRL^{lpr/lpr}) modificado genéticamente para bloquear la secreción de anticuerpos, que la capacidad de las células B para actuar como presentadoras de antígenos era suficiente para el mantenimiento de la patología en estos animales (Chan et al., 1999). Las células B de zona marginal son particularmente eficientes en la presentación de antígenos (Attanavanich and Kearney, 2004). Esta característica unida a la predisposición de estas células a presentar BCRs autorreactivos (Li et al., 2002; Martin and Kearney, 2000) es una combinación que puede ser clave en el desarrollo de respuestas autoinmunes.

Por último es importante destacar el papel de las hormonas sexuales en la autoinmunidad mediada por células B. Los desórdenes autoinmunes dependientes de

células B, como artritis reumatoide (RA, del inglés, *Reumathoid Arthritis*), SLE o el síndrome de Sjögren, muestran una mayor prevalencia en mujeres que en hombres (Rider and Abdou, 2001; Whitacre, 2001), lo que sugiere que las hormonas sexuales juegan un papel crucial en la susceptibilidad a estas enfermedades (Castagnetta et al., 2002). A nivel molecular se ha demostrado que la señalización a través del receptor de estrógenos en células B inmaduras permite eludir las señales de apoptosis enviadas por el BCR (Grimaldi et al., 2002). De este modo, niveles anormalmente altos de estrógenos pueden favorecer la evasión de los mecanismos de tolerancia central y por tanto la generación de células B autorreactivas. Este incremento en los estrógenos resulta también en alteraciones en el destino celular de las células transicionales que favorecen la diferenciación de células de zona marginal (Grimaldi et al., 2002). De este modo las hormonas sexuales pueden afectar a los mecanismos de tolerancia de células B modificando los umbrales de supervivencia y activación de las mismas.

PARTE II: MicroRNAs y respuesta inmune

Biogénesis y función de los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA de cadena sencilla que actúan como reguladores negativos de la expresión génica a nivel post-transcripcional, reduciendo la estabilidad o a la eficiencia de traducción de RNAs mensajeros (mRNA, del inglés, *messenger RNA*).

Los genes que codifican los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II generando un pri-miRNA que debe ser procesado hasta dar lugar a la molécula efectora madura. El procesamiento intranuclear se lleva a cabo por la enzima Drosha, una RNasa III que transforma el pri-miRNA en un precursor de unos 70 nucleótidos (pre-miRNA). Éste abandona el núcleo y una vez en el citoplasma sufre un proceso de maduración mediado por una segunda RNasa III, Dicer, alcanzando su forma madura capaz de llevar a cabo su función reguladora. El miRNA es entonces cargado en un complejo ribonucleoproteico denominado RISC (del inglés, *RNA-Induced Silencing Complex*), que se unirá a la región 3'UTR del mRNA a regular. El reconocimiento se lleva a cabo por complementariedad imperfecta de bases entre el miRNA y su mRNA diana y resulta en la inhibición de la traducción del mRNA o en su desestabilización vía deadenilación (Bartel, 2009) (**Fig. 4**).

La acción de los miRNAs controla funciones tan importantes como la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis (Bushati and Cohen, 2007) y su expresión aberrante se ha vinculado a procesos de transformación celular y tumorigénesis (Kumar et al., 2007). Además, el análisis de distintas clases de neoplasias y particularmente de linfomas, ha revelado la existencia de patrones de expresión de miRNAs concretos asociados a cada tipo de transformación (Lu et al., 2005).

Para abordar el estudio de los mecanismos de control ejercidos por miRNAs en mamíferos, se han desarrollado modelos murinos en los que el gen de Dicer (*Dicer1*) se inactiva de forma tejido específica. La ausencia de Dicer en línea germinal es letal durante la etapa embrionaria (Bernstein et al., 2003) y los sistemas específicos de tejido han permitido demostrar los efectos funcionales derivados de la ausencia de

miRNAs en un determinado tipo celular, en un contexto en el que Dicer sigue expresándose normalmente en el resto de tejidos.

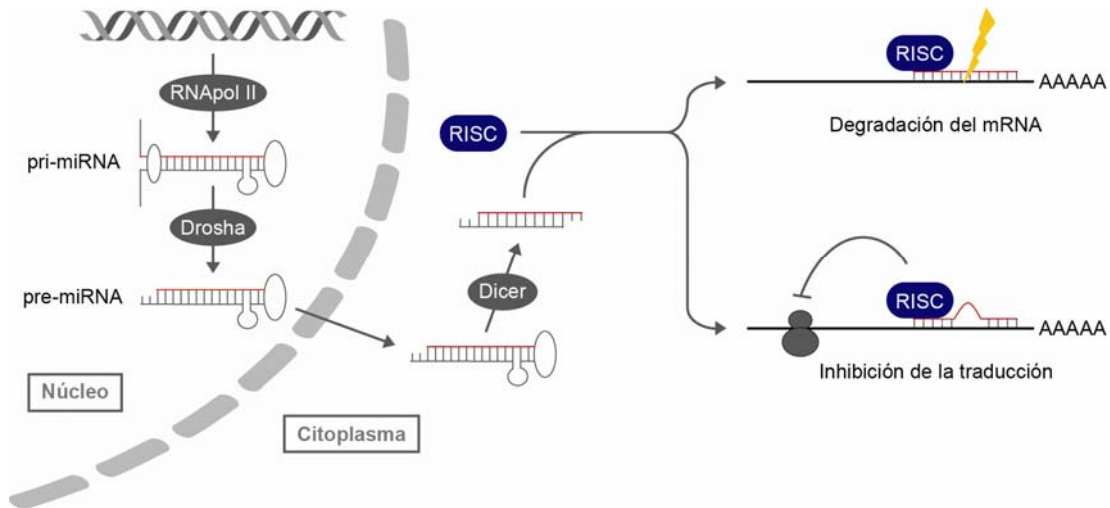


Figura 4 - Biogénesis y función de microRNAs

Los microRNAs se transcriben en el núcleo por la RNA polimerasa II, dando lugar a un pri-miRNA que tiene que ser procesado hasta llegar a su forma madura funcional. Esto ocurre gracias a la actividad de dos RNAsas denominadas Droscha y Dicer. El primer procesamiento es llevado a cabo por Droscha en el núcleo y genera un precursor o pre-miRNA que abandona el núcleo. Una vez en el citoplasma, Dicer realiza la segunda etapa de maduración que permite alcanzar la forma efectora del miRNA. Éste es entonces cargado en un complejo ribonucleoproteico (RISC) desde el cual puede promover el silenciamiento génico de sus dianas mediante dos mecanismos: inducción de la degradación del mRNA o bloqueo de la traducción del mismo.

MicroRNAs e inmunidad adaptativa

Los miRNAs actúan como elementos reguladores del sistema inmune participando en el control de la diferenciación, la homeostasis y la respuesta a patógenos mediante mecanismos muy diversos y altamente específicos. La regulación de la expresión génica llevada a cabo por miRNAs permite la modulación de los niveles de sus proteínas diana dentro de unos rangos muy discretos. Sin embargo, estas variaciones sutiles pueden acarrear importantes efectos fisiológicos (Xiao and Rajewsky, 2009).

En los últimos años numerosos trabajos han demostrado que la función de los

miRNAs es esencial para la correcta diferenciación de las células T y B. En el primer estudio que demostró que los miRNAs podían influir en el desarrollo del sistema hematopoyético se observó que la sobreexpresión de miR181a favorecía la diferenciación de células B sin afectar los números de células T ni del linaje mieloide (Chen et al., 2004). A partir de ese momento se ha profundizado en esta cuestión con distintos abordajes experimentales.

En células T la delección específica de Dicer ha revelado que su desarrollo es dependiente de la presencia de miRNAs, ya que su ausencia supone una reducción en el número absoluto de células T maduras (Cobb et al., 2005; Muljo et al., 2005). Se han encontrado dos miRNAs específicos que participan en la regulación de la diferenciación de células T y podrían dar cuenta del fenotipo observado en ausencia de Dicer. Por una parte, miR17-92 reduce la expresión de los factores pro-apoptóticos Bim y PTEN, incrementando la supervivencia de las células T durante su desarrollo (Xiao et al., 2008). Por otra, la intensidad de la señal a través del TCR determina si los timocitos son seleccionados positiva o negativamente y se ha demostrado que miR181a incrementa esta señalización mediante la modulación de los niveles de expresión de las fosfatasa DUSP5, DUSP6, SHP2 y PTPN22 (Li et al., 2007). También se ha encontrado que los miRNAs participan en la generación de los distintos subtipos de células T, como es el caso miR155 y miR326 que favorecen la diferenciación de células T_{H1} y T_{H17} respectivamente (Du et al., 2009; Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007). Por último, la delección de Dicer en células T reguladoras (T_{reg}) bloquea la generación de las mismas lo que resulta en una enfermedad autoinmune letal, consistente con otros modelos en los que la diferenciación o función de células T_{reg} está comprometida (Chong et al., 2008; Liston et al., 2008; Zhou et al., 2008).

En cuanto a células B, el primer trabajo que estudió las consecuencias de una deficiencia global de miRNAs en el desarrollo de este linaje consistió en la delección condicional de Ago2, un componente del RISC, en células hematopoyéticas. La reducción parcial de la función de los miRNAs en este modelo comprometía la diferenciación de las células B y de la línea eritroide (O'Carroll et al., 2007). Posteriormente, la delección de Dicer en los estadios más tempranos del desarrollo de células B demostró que los miRNAs eran esenciales para el desarrollo de las mismas en médula ósea, observándose un bloqueo absoluto de la diferenciación en el estadio proB (Koralov et al., 2008). Este fenotipo está al menos en parte debido a la desregulación del factor pro-apoptótico Bim, cuyos niveles están aumentados durante

la diferenciación en la médula ósea de ratones deficientes en Dicer e inducen la apoptosis masiva de los precursores preB. De acuerdo con esta observación, la sobreexpresión del gen anti-apoptótico Bcl2 permite superar parcialmente este bloqueo; sin embargo las células maduras generadas presentan una distribución anormal de los reordenamientos V(D)J, lo que parece indicar la existencia de defectos en los mecanismos de selección de células B (Koralov et al., 2008). En definitiva, estos datos demuestran que los miRNAs son fundamentales durante la diferenciación temprana de células B, aunque el bloqueo observado en la médula ósea hace que este modelo no permita extraer conclusiones sobre el papel de los mismos en estadios más tardíos o en células B maduras. Se ha sugerido que las alteraciones fenotípicas observadas en las células B deficientes para Dicer podrían estar mediadas por el *cluster* miR17-92: las células deficientes para miR17-92 también presentan una expresión incrementada del factor Bim que inhibe la diferenciación de las células B en la transición proB - preB (Ventura et al., 2008). Por el contrario, la sobreexpresión de miR17-92 se ha asociado con síndromes linfoproliferativos patológicos en ratones y humanos (Xiao et al., 2008). Los miRNAs también pueden regular factores de transcripción que participan en la diferenciación temprana de células B. La expresión constitutiva de miR150 produce un bloqueo en el estadio proB producto de la desregulación de Myb (Zhou et al., 2007), mientras que la deficiencia de este miRNA resulta en la acumulación de células B1 en el bazo y la cavidad peritoneal y la reducción del número de células B foliculares (Xiao et al., 2007). También se han descrito miRNAs implicados en el desarrollo de la respuesta inmune humoral. Las células B deficientes para miR155 presentan defectos en la recombinación de cambio de isotipo y la generación de células plasmáticas, comprometiendo la respuesta inmune humoral frente a antígenos T-dependientes (Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007; Vigorito et al., 2007). Este fenotipo se debe probablemente a defectos en la regulación del factor de transcripción PU.1 y la deaminasa AID, ya que ambos son dianas directas de miR155 (Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008; Vigorito et al., 2007). Los niveles de AID se encuentran además controlados por un segundo miRNA, miR181b. La sobreexpresión de miR181b en células B activadas reduce la expresión de AID, comprometiendo la eficiencia de cambio de isotipo (de Yebenes et al., 2008).

Todos estos estudios indican que los miRNAs juegan un importante papel en el desarrollo y función de la inmunidad adaptativa. Como consecuencia, defectos en la expresión o regulación de determinados miRNAs podrían estar asociados con la aparición de enfermedades inmunológicas.

miRNAs y autoinmunidad

El papel de los miRNAs en el contexto de las enfermedades autoinmunes es un nuevo campo abierto al estudio, si bien hasta la fecha son pocos los trabajos realizados que han abordado esta cuestión, la mayoría de los cuales se ha centrado en el estudio de patrones de expresión de miRNAs.

En pacientes con RA, el análisis de tejido sinovial mostró cambios en la expresión de ciertos miRNAs, con un incremento en los niveles de miR155 y miR146a (Pauley et al., 2008). Por otra parte, la estimulación con LPS de sinoviocitos de estos pacientes produce alteraciones en la expresión de miRNAs, como miR346 que actúa como regulador indirecto de la producción de la citoquina inflamatoria IL18 (Alsaleh et al., 2009).

Otros estudios han identificado miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de pacientes con esclerosis múltiple (MS, del inglés, *Multiple Sclerosis*), como son miR18b, miR599, miR96 y miR326 (Du et al., 2009; Otaegui et al., 2009). Los niveles incrementados de este último miRNA en pacientes con MS puede afectar a la severidad de la enfermedad, ya que favorecen la generación de células T_H17, que son importantes mediadoras del daño tisular durante la inflamación (Du et al., 2009).

Del mismo modo, el análisis de la expresión de miRNAs en PBMC de pacientes con SLE ha revelado distintas alteraciones, siendo especialmente interesante la reducción en los niveles de miR146a (Dai et al., 2007; Tang et al., 2009). Este miRNA tiene como dianas directas factores reguladores de la ruta de señalización del interferón (IFN), que se encuentra anormalmente activa en pacientes con SLE. La introducción de miR146a en las PBMC de estos pacientes consigue regular negativamente la vía del IFN, lo que sugiere que la deficiencia de miR146a puede ser uno de los factores causales de la hiperactivación observada en esta ruta en SLE (Lu et al., 2010; Tang et al., 2009).

Otras evidencias de la relación causal entre miRNAs específicos y el desarrollo de autoinmunidad han venido de modelos animales, como es el caso de la sobreexpresión de miR17-92 en ratones. Estos animales presentan un fenotipo autoinmune, con linfoproliferación anormal, autoanticuerpos en suero y alteraciones tisulares, como infiltraciones linfoides y deposición de anticuerpos (Xiao et al., 2008).

La relevancia de éste y otros estudios similares en el inicio o mantenimiento de desórdenes autoinmunes humanos aún no ha sido abordada.

En conclusión, los datos obtenidos hasta el momento parecen indicar que la desregulación de la expresión de ciertos miRNAs puede jugar un papel importante en la patogénesis de distintas enfermedades autoinmunes.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es estudiar el papel de los miRNAs en la regulación de distintos aspectos fisiológicos de las células B mediante el análisis de un modelo murino (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}) en el que la generación de miRNAs maduros está bloqueada en el linaje B. Los objetivos concretos del estudio son los siguientes:

1. Caracterización fenotípica de la población B de médula ósea y tejidos linfoides periféricos en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}
2. Caracterización funcional de las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}
3. Valoración de las implicaciones fisiológicas de la ausencia de miRNAs sobre la inmunidad humoral

Resultados

Parte I: Análisis fenotípico de la población B

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante capaces de regular la expresión génica post-transcripcionalmente mediante la degradación de mRNAs o la inhibición de su traducción. En los últimos años se ha demostrado que los miRNAs son esenciales para el correcto funcionamiento de numerosos procesos biológicos (Bushati and Cohen, 2007). Una de las enzimas implicadas en la generación de los miRNAs es la endonucleasa Dicer (Bernstein et al., 2003). Por ello, para estudiar los efectos de una deficiencia global de miRNAs en tipos celulares concretos, se han diseñado distintos modelos murinos en los que la delección del gen de Dicer ocurre de manera tejida específica.

En nuestro caso el objetivo es estudiar el papel de los miRNAs en la diferenciación y función de células B. Para ello se generó un modelo murino deficiente condicional para Dicer exclusivamente en células B mediante la utilización del sistema de recombinación Cre/loxP (Sauer and Henderson, 1988). Este sistema permite la delección específica de fragmentos de DNA que se encuentran flanqueados por sitios loxP por acción de la recombinasa Cre. Los animales de interés se generaron mediante el cruce de ratones Dicer^{fl/fl} (Harfe et al., 2005) y CD19-Cre^{Ki/+} (Rickert et al., 1997). Los primeros presentan la secuencia del dominio RNAsIII de Dicer flanqueada por sitios loxP. Su delección elimina la función de la endonucleasa y bloquea por tanto la maduración de los miRNAs. Por su parte, los animales CD19-Cre^{Ki/+} expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del gen que codifica para CD19, cuya expresión es exclusiva de células B. La combinación de estos dos modelos resulta en la delección de Dicer de forma tejida específica en células B, lo que permite estudiar los efectos derivados de la ausencia de miRNAs en este tipo celular.

Diferenciación temprana de células B en médula ósea

La diferenciación del linaje B en médula ósea es un proceso secuencial que atraviesa distintas etapas hasta alcanzar el estadio de célula B inmadura. Cada precursor B presenta unas características funcionales y fenotípicas particulares, que incluyen la presencia de una serie de moléculas de membrana cuya expresión

diferencial permite la caracterización de los distintos estadios de desarrollo. La expresión de CD19 comienza en el estadio proB (Hardy and Hayakawa, 2001). En los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} la aparición de ese marcador va a marcar el comienzo de la expresión de la recombinasa Cre, que podrá entonces inducir la delección de Dicer. Por tanto, en este modelo potencialmente se podrían observar efectos en la desarrollo de las células B a partir del estadio proB.

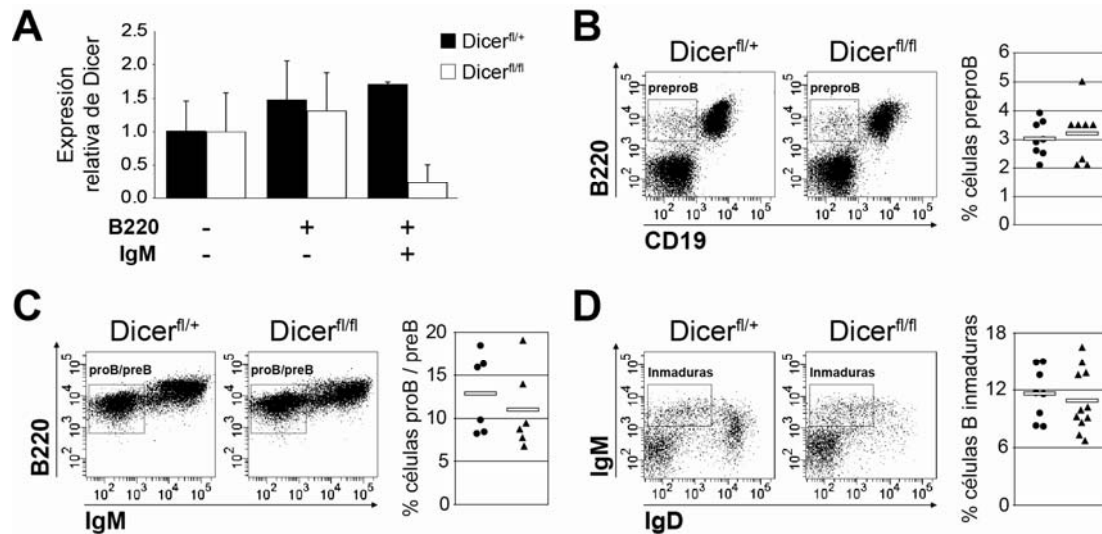


Figura 5 - Diferenciación de células B en médula ósea de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

(A) Análisis de la expresión de Dicer médula ósea de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (barras negras) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (barras blancas). Las distintas poblaciones se aislaron por citometría de flujo preparativa según la expresión de B220 e IgM y la expresión del mRNA de Dicer fue determinada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados se normalizaron a los niveles de Dicer en células B220⁺. Las barras de error representan la desviación estándar de cuatro experimentos independientes (B220⁺ IgM⁺: n=4, p<0.01). (B-D) Análisis fenotípico de médula ósea de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}). Las suspensiones celulares se marcaron con los anticuerpos indicados y se analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen diagramas representativos de los análisis citométricos sobre células totales (B y D) o CD19⁺ (C). Los gráficos a la derecha muestran la frecuencia sobre células totales de las siguientes poblaciones: (B) células preproB (B220⁺ CD19⁻), (C) células proB / preB (CD19⁺ IgM⁻) y (D) células B inmaduras (IgM⁺ IgD⁻). Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y los triángulos a los CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La barra horizontal muestra la media de los valores (preproB: n=8, p=0.48; proB / preB: n=6, p=0.68; B inmaduras: n=8-11, p=0.68).

En primer lugar se quiso establecer la cinética de desaparición de Dicer en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Para ello se aislaron precursores B mediante citometría de flujo preparativa en base a la expresión de los marcadores B220 e IgM y se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés, *Real*

Time quantitative PCR) los niveles de expresión de mRNA de Dicer (**Fig. 5a**). Este análisis indica que, de acuerdo con estudios previos, la delección mediada por CD19-Cre es gradual durante la diferenciación B en médula ósea y se completa en estadios relativamente tardíos (células B inmaduras), en las que la expresión de Dicer es aproximadamente un 10% de los niveles observados en animales control.

Para estudiar las posibles alteraciones en el proceso de diferenciación, se analizaron las médulas óseas de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (control) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de los precursores de células B en distintos estadios de diferenciación. No se observaron diferencias significativas en las proporciones de células preproB (B220⁺ CD19⁻) (**Fig. 5b**), proB / preB (B220⁺ CD19⁺ IgM⁻) (**Fig. 5c**) y B inmaduras (B220⁺ CD19⁺ IgM⁺ IgD⁻) (**Fig. 5d**) entre animales control y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Este resultado es consistente con la cinética de depleción de Dicer durante la diferenciación en médula ósea e indica que ésta ocurre sin alteraciones detectables hasta el estadio de células B inmaduras.

Células B en tejidos linfoides periféricos

Los resultados anteriores demuestran una reducción tardía en los niveles de Dicer, compatible con la generación de células B inmaduras. Para determinar las posibles implicaciones fisiológicas derivadas de ausencia de miRNAs en etapas posteriores del desarrollo se analizaron tejidos linfoides periféricos de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mediante citometría de flujo para establecer la participación de la población B en los mismos. Encontramos que los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} tenían una reducción generalizada en los números de células B (B220⁺) en bazo (30%) (**Fig. 6a** y **Tabla 1**), nódulos linfáticos (60%) (**Fig. 6b**) y placas de Peyer (30%) (**Fig. 6c**). Del mismo modo, la presencia de células B recirculantes en médula ósea (procedentes de tejidos periféricos) se encontraba disminuida aproximadamente un 65% en ratones deficientes para Dicer (**Fig. 6d**).

De acuerdo con la especificidad B del modelo de delección CD19-Cre, no encontramos diferencias en el número de células no-B (B220⁻) (**Fig. 7a** y **Tabla 1**) ni en la expresión de Dicer en las mismas (**Fig. 7b**) entre animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Tampoco existen alteraciones en los porcentajes de células T (**Fig. 7c**) y macrófagos (**Fig. 7d**).

Estos resultados indican que la delección de Dicer y el consecuente bloqueo en la maduración de miRNAs en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} compromete la correcta generación y/o mantenimiento de la población de células B en la periferia.

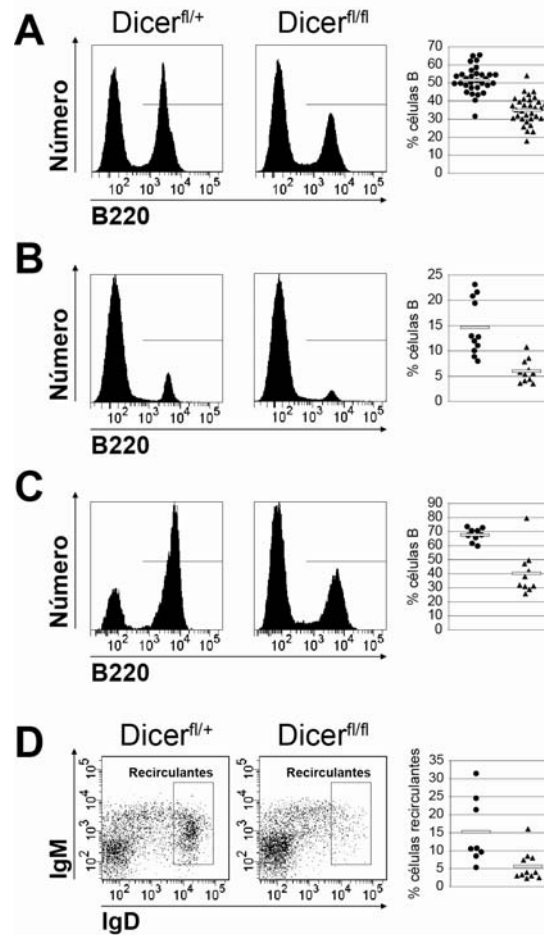
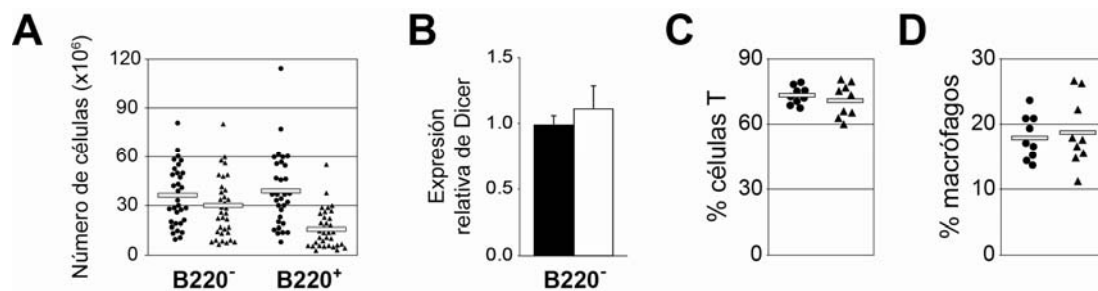


Figura 6 - Población B periférica de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Análisis fenotípico de bazo (A), nódulos linfáticos (B), placas de Peyer (C) y médula ósea (D) de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}). Las suspensiones celulares se marcaron con los anticuerpos indicados y se analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen diagramas representativos de los análisis citométricos sobre células totales. Los gráficos a la derecha muestran la frecuencia de: (A - C) células B totales (B220+) y (D) células B recirculantes (IgD+). Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y los triángulos a los CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La barra horizontal muestra la media de los valores (células B totales: bazo, n=31-33, p<0.01; nódulos linfáticos, n=11, p<0.01; placas de Peyer, n=9-10, p<0.01; células recirculantes: médula ósea, n=8-11, p<0.01).

Tabla 1 - Porcentaje y número absoluto de células B220⁻ y B220⁺ en bazo^a Porcentaje sobre el total de células de bazo, ^b número absoluto de células en bazo ($\times 10^6$).

		Porcentaje ^a		Número ($\times 106$) ^b	
		Dicer ^{fl/+}	Dicer ^{fl/fl}	Dicer ^{fl/+}	Dicer ^{fl/fl}
B220 ⁻	Media	48.4	65.0	35.9	29.6
	Desviación Estándar	7.2	7.5	18.3	18.1
	p valor	< 0.0001		0.1641	
B220 ⁺	Media	51.6	35.0	39.2	16.0
	Desviación Estándar	7.2	7.5	22.3	11.7
	p valor	< 0.0001		< 0.0001	

Figura 7 - Los linajes no-B no se encuentran alterados en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

(A) Número absoluto de células B220⁻ y B220⁺ en bazo. El número total de células se determinó por conteo en suspensiones celulares de bazos de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. A continuación las células se marcaron con anticuerpo anti-B220 y se analizaron por citometría de flujo. Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y los triángulos a los CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La barra horizontal muestra la media de los valores (B220⁻: n=32-34, p=0.16; B220⁺: n=32-34, p<0.01). (B) La expresión de Dicer no está alterada en células B220⁻ de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Las células B220⁻ de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (barras negras) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (barras blancas) se aislaron por citometría de flujo preparativa y la expresión de Dicer se determinó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados se normalizaron a los niveles de expresión de Dicer en células B220⁻ de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3, p=0.23). (C - D) Las proporciones de células T y macrófagos no están alteradas en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Las suspensiones celulares se prepararon a partir de bazos de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, se marcaron con los anticuerpos anti-B220, anti-CD3 y anti-Mac1 y se analizaron por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células T (C) y de macrófagos (D) sobre células B220⁻. Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y los triángulos a los CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La barra horizontal muestra la media de los valores (células T: n=9, p=0.43; macrófagos: n=9, p=0.72).

Subpoblaciones de células B en bazo

En la periferia las células B inmaduras que abandonan la médula ósea dan lugar a las células B transicionales, las cuales generan en el bazo las dos grandes poblaciones de células B maduras: células foliculares y de zona marginal. La reducción del número de células B observada en ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ en ausencia de alteraciones en la generación de las mismas en médula ósea podría ser el resultado de defectos en estas últimas etapas de la diferenciación B. Para determinar la eficiencia con la que éstas se estaban llevando a cabo, se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones de células B transicionales, foliculares y de zona marginal en bazos de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$. Encontramos proporciones alteradas de estos subtipos de celulares en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, con un incremento de dos veces en el porcentaje de células de zona marginal ($B220^+ CD21^{++} CD23^+$) y de dos veces y media en el de transicionales ($B220^+ CD21^+ CD23^{++} CD93^+$) (Fig. 8a y b) y una reducción del 60% en el porcentaje de células foliculares ($B220^+ CD21^+ CD23^{++} CD93^-$) (Fig. 8b).

Para terminar de caracterizar el fenotipo se analizaron también las proporciones de las células B1, un subtipo de células B de origen embrionario que están también presentes en el bazo. En animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ tanto la proporción de células B1a ($B220^+ CD43^+ CD5^+$) como de B1b ($B220^+ CD43^+ CD5^-$) se encontraba incrementada (Fig. 8c). Todas estas alteraciones porcentuales responden principalmente a la disminución dramática (80%) en el número absoluto de células foliculares en ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (Tabla 2). El análisis histológico de los bazos confirmó estos resultados, existiendo una reducción global en la proporción de células B ($Pax5^+$) en la región folicular de la pulpa blanca en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (Fig. 9a, panel superior), mientras que en la región de células T ($CD3^+$) en el interior del folículo no se observó ninguna anomalía (Fig. 9a, panel inferior).

A continuación se analizó la expresión de Dicer en células B transicionales, de zona marginal y foliculares. Para ello, las distintas poblaciones se aislaron por citometría de flujo preparativa de bazos de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ y se determinaron los niveles de mRNA de Dicer mediante RT-qPCR. En animales control ($CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$), observamos que las células foliculares presentan la mayor expresión de Dicer dentro de las poblaciones B de bazo, con niveles un 56% más altos que en células de zona marginal y un 2.5 veces superiores a los de células transicionales (Fig. 9b). En el caso de los ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$

y como cabría esperar, los niveles de Dicer se encuentran muy disminuidos en todas las poblaciones de bazo, con una reducción de la expresión de aproximadamente el 80% en todas las poblaciones. Sin embargo observamos la misma tendencia que en animales control, con una mayor expresión en células foliculares (Fig. 9b). Este resultado indica que la expresión de Dicer se encuentra estrictamente regulada durante la diferenciación de células B transicionales a células de zona marginal o foliculares. La dramática reducción del número de células foliculares en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ unida a los altos niveles de Dicer en esta población en ratones control parece indicar que la presencia de miRNAs es particularmente importante para su correcta diferenciación.

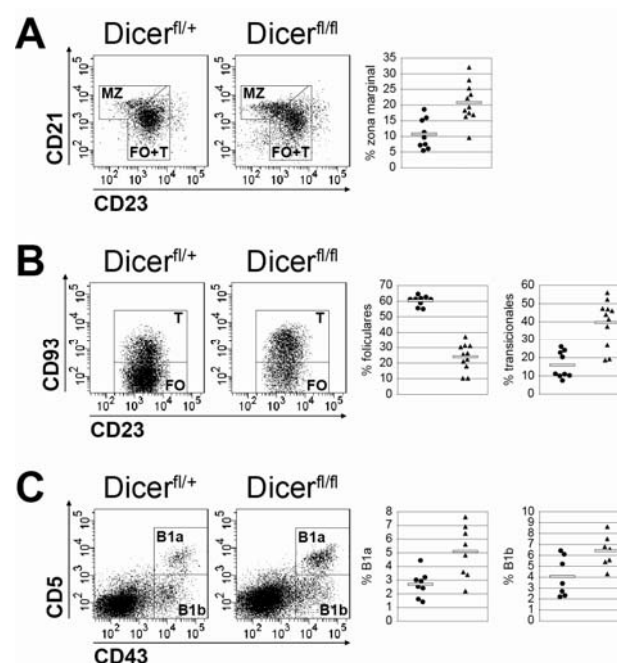


Figura 8 - Subpoblaciones B periféricas en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$

(A - C) Análisis de las poblaciones de células B en bazo de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ ($Dicer^{fl/+}$) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ ($Dicer^{fl/fl}$). Las suspensiones celulares se marcaron con los anticuerpos indicados y se analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen diagramas representativos de los análisis citométricos sobre células $B220^+$ (A y C) o $B220^+ CD21^+ CD23^{++}$ (B). Los gráficos a la derecha muestran la frecuencia sobre células $B220^+$ de las siguientes poblaciones: (A) células de zona marginal (MZ, $CD21^{++} CD23^+$), (B) células foliculares (FO, $CD21^+ CD23^{++} CD93^+$) y transicionales (T, $CD21^+ CD23^{++} CD93^+$) y (C) células B1a ($CD5^+ CD43^+$) y B1b ($CD5^- CD43^+$). Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y los triángulos a los $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$. La barra horizontal muestra la media de los valores (MZ: n=9-11, p<0.01; FO: n=9-11, p<0.01; T: n=9-11, p<0.01; B1a: n=8, p<0.01; B1b: n=7, p=0.02).

Tabla 2 - Porcentaje y número absoluto de subpoblaciones de células B en bazo

^a Células B transicionales B220⁺ CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁺, ^b células B foliculares B220⁺ CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁻, ^c células B de zona marginal B220⁺ CD21⁺⁺ CD23⁺, ^d porcentaje sobre células B220⁺, ^e número absoluto de células en bazo (x 10⁶).

		Porcentaje ^d		Número (x 106) ^e	
		Dicer ^{fl/+}	Dicer ^{fl/fl}	Dicer ^{fl/+}	Dicer ^{fl/fl}
Transicionales ^a	Media	16.0	39.8	5.8	7.8
	Desviación Estándar	7.3	12.8	3.2	5.8
	p valor	0.0001		0.3549	
Foliculares ^b	Media	60.4	24.1	21.1	4.5
	Desviación Estándar	3.2	8.6	4.3	3.3
	p valor	< 0.0001		< 0.0001	
Zona Marginal ^c	Media	10.8	20.8	3.7	1.8
	Desviación Estándar	4.8	6.2	3.6	2.0
	p valor	0.0009		0.8524	

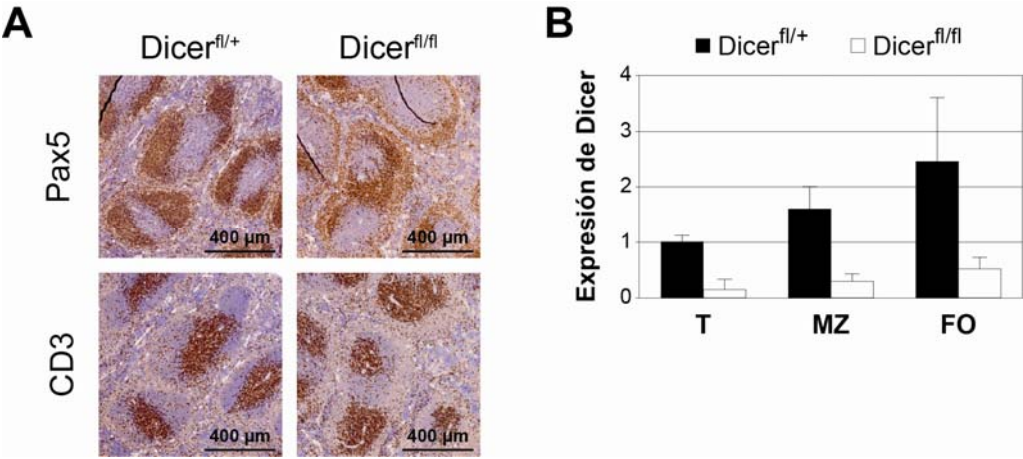


Figura 9 - Análisis histológico y expresión de Dicer en poblaciones B periféricas

(A) Marcaje de Pax5 (panel superior) y CD3 (panel inferior) en cortes histológicos parafinados de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}). La escala se muestra en cada microfotografía. (B) Expresión de Dicer en células transicionales (T), de zona marginal (MZ) y foliculares (FO) de bazo de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (barras negras) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (barras blancas). Las distintas poblaciones se aislaron por citometría de flujo preparativa de acuerdo a la expresión de los marcadores B220, CD21, CD23 y CD93 y la expresión de Dicer se determinó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados se normalizaron a los niveles de expresión de Dicer en células transicionales de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}. Las barras de error representan la desviación estándar (T: n=3, p<0.01; MZ: n=3, p<0.01; FO: n=3, p=0.04).

Ensayos de competición en quimeras de médula ósea

Los ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ presentan una reducción drástica del número de células foliculares, mientras que las poblaciones de células transicionales y de zona marginal son normales (Tabla 2). Se han descrito modelos murinos con deficiencias en la generación de células B en los que la proporción de células de zona marginal se encuentra incrementada en detrimento de la población folicular (Carvalho et al., 2001; Hao and Rajewsky, 2001; Harfst et al., 2005; Johnson et al., 2002). Algunos autores han sugerido que este fenómeno podría ser producto de un mecanismo homeostático que compensara la linfopenia B favoreciendo la repoblación periférica con células de zona marginal con el fin de asegurar una primera barrera defensiva frente a infecciones (Martin and Kearney, 2002). Por este motivo es importante discriminar si el fenotipo de los animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ es un mecanismo compensatorio derivado de la linfopenia o si, por el contrario, la ausencia de miRNAs es directamente responsable de alterar la diferenciación de las células de zona marginal y foliculares.

Para resolver esta cuestión se realizaron ensayos de reconstitución hematopoyética con el fin de generar animales quiméricos en los que la deficiencia numérica de las células B $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ quedara compensada por la presencia de células *wild type*. Para ello se usaron como receptores ratones $CD45.2^+$ a los que se irradió letalmente y pasadas 24 horas se transplantaron con células de médula ósea de ratones donantes $CD45.1^+$ *wild type*, $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$. La figura 10 muestra un esquema gráfico del desarrollo experimental con las distintas quimeras generadas. Los grupos A, B y C son reconstituciones simples con un solo tipo celular y utilizadas como controles experimentales: A, reconstituido con células $CD45.1^+$ (representado de color amarillo); B, reconstituido con células $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ (azul) y C, reconstituido con células $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (verde). Los grupos D y E son trasplantes con mezclas 1:1 de células $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ (azul y amarillo) o $CD45.2^+$ $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (verde y amarillo) en competición con células $CD45.1^+$. Por último, el grupo F no recibió trasplante (blanco) y se utilizó como control de irradiación. Los animales de este grupo murieron pocos días después de la misma.

Los grupos restantes se sacrificaron 12 semanas después de la reconstitución y se analizó la población B en médula ósea y bazo. En los animales reconstituidos únicamente con células $CD45.1^+$ *wild type* (grupo A) el porcentaje de células B

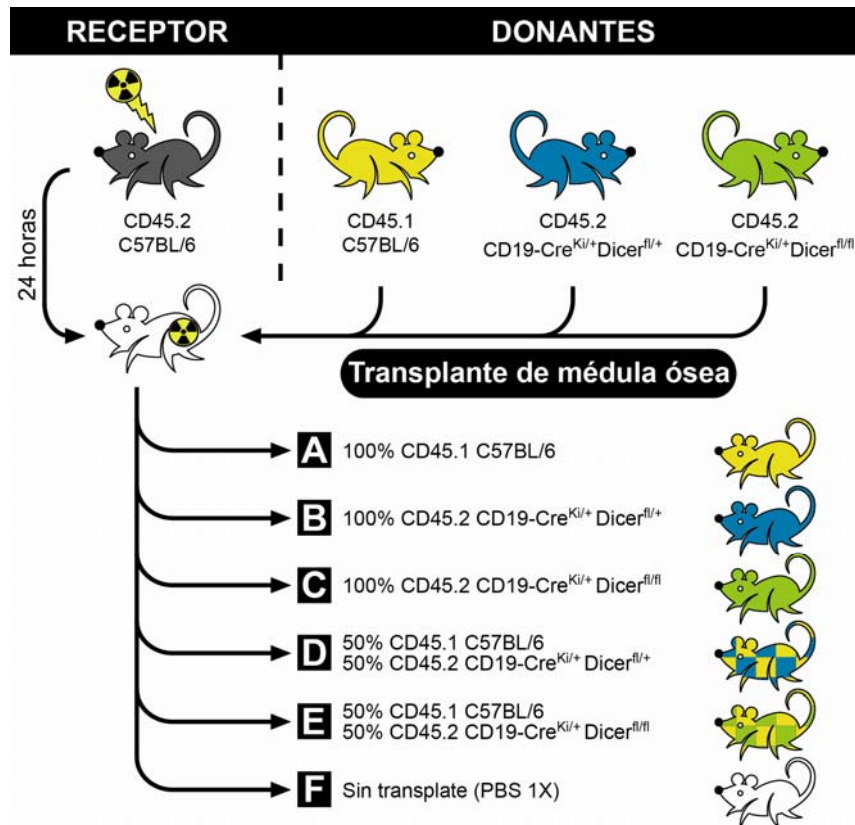


Figura 10 - Experimentos de reconstitución hematopoyética

Las reconstituciones hematopoyéticas se realizaron por trasplante de médula ósea en ratones CD45.2 C57BL/6 irradiados letalmente. Como animales donantes para la reconstitución se utilizaron ratones CD45.1 C57BL/6, CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/+} y CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/fl}, representados en la figura con los colores amarillo, azul y verde respectivamente. 24 horas después de la irradiación se inyectaron cinco millones de células de médula ósea por vía intravenosa en los receptores (grupos A - E). En los grupos A, B y C, el total de las células utilizadas para la reconstitución provenían de un solo genotipo: CD45.1 C57BL/6 (grupo A), CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/+} (grupo B) o CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/fl} (grupo C). Los ensayos de competición se realizaron con los grupos D y E que fueron trasplantados con mezclas 1:1 de células CD45.1 C57BL/6 con CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/+} (grupo D) o CD45.2 CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/fl} (grupo E). Por último, los animales no reconstituidos del grupo F (inyectados con PBS) fueron utilizados como control de la eficiencia de la irradiación y murieron pocos días después de la misma.

CD45.2⁺ era menor del 1%, lo que indica que la posible contribución de progenitores B procedentes del receptor es despreciable (datos no mostrados). Por su parte, al comparar los ratones trasplantados sólo con células CD45.2⁺ CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/+} (grupo B) con aquellos reconstituidos sólo con células CD45.2⁺ CD19-Cre^{Kl/+} Dicer^{fl/fl} (grupos C), se observó en estos últimos una reducción en el número de células B, particularmente de células recirculantes en médula ósea (**Fig. 11a**, panel superior) y foliculares en bazo (**Fig. 11a**, panel inferior), así como un incremento en la

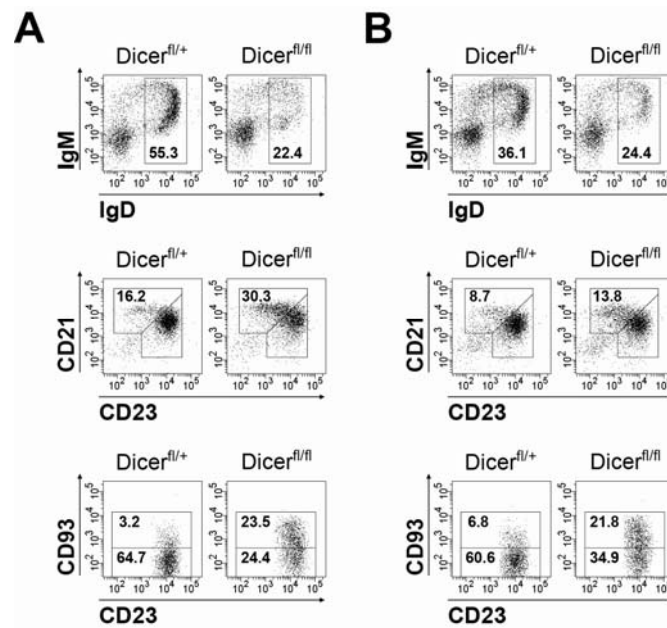


Figura 11 - Análisis de la población B en ensayos de reconstitución hematopoyética

Análisis fenotípico de médula ósea y bazo de ratones irradiados letalmente y reconstituidos por trasplante de médula ósea con (A) células CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Grupo B, Dicer^{fl/+}) o CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Grupo C, Dicer^{fl/fl}) y (B) mezclas 1:1 de células wild type CD45.1 con células CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Grupo D, Dicer^{fl/+}) o CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Grupo E, Dicer^{fl/fl}). Los ratones se sacrificaron 12 semanas después del trasplante y las médulas óseas y los bazos se analizaron por citometría de flujo con los anticuerpos indicados. En la figura se incluyen diagramas representativos de los análisis citométricos sobre células B220⁺ CD45.2⁺ de médula ósea (panel superior) y bazo (panel intermedio) y sobre células B220⁺ CD45.2⁺ CD23⁺⁺ de bazo (panel inferior). Los números representan el porcentaje medio sobre células B220⁺ CD45.2⁺ de las siguientes poblaciones: panel superior, células recirculantes (IgD⁺) (A: n=3, p<0.01; B: n=4 p<0.01) de médula ósea; panel intermedio, células B de zona marginal (CD21⁺⁺ CD23⁺) (A: n=3, p<0.01; B: n=4 p=0.03) de bazo; panel inferior, células B foliculares (CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁻) (A: n=3, p<0.01; B: n=4 p<0.01) y transicionales (CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁺) (A: n=3, p<0.01; B: n=4 p<0.01) de bazo.

proporción de células transicionales y de zona marginal (**Fig. 11a**, paneles medio e inferior). Este resultado demuestra que los animales reconstituidos presentan el mismo fenotipo que los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La linfopenia B observada en las reconstituciones simples (grupo C) se encuentra compensada en los animales trasplantados con células CD45.2⁺ CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} en competición con CD45.1⁺ (grupo E) por la presencia de progenitores *wild type*, no existiendo diferencias significativas entre los números absolutos de células B de estos animales y aquellos reconstituidos con células CD45.2⁺ CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} en competición con CD45.1⁺ (grupo D) (**Tabla 3**). Sin embargo, el análisis de poblaciones demostró que las células CD45.2⁺ CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} en las quimeras mixtas continuaban presentando las

alteraciones propias de los animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, con una reducción de aproximadamente un 30% en porcentaje de células recirculantes en médula ósea (Fig. 11b, panel superior) y de un 40% en la población folicular de bazo (Fig. 11b, panel inferior, y Tabla 4) y un incremento de tres veces en el porcentaje de células transicionales y de más del 50% en las células de zona marginal (Fig. 11b, paneles medio e inferior, y Tabla 4).

Estos resultados indican que el incremento proporcional de células de zona marginal en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ no es producto de una respuesta homeostática derivada de la linfopenia B, sino que se trata de una alteración intrínseca al proceso de diferenciación como consecuencia de la ausencia de miRNAs.

Tabla 3 - Porcentaje y número absoluto de células B transicionales, foliculares y de zona marginal en quimeras mixtas

^a Células B transicionales $B220^+ CD21^+ CD23^{++} CD93^+$, ^b células B foliculares $B220^+ CD21^+ CD23^{++} CD93^-$, ^c células B de zona marginal $B220^+ CD21^{++} CD23^+$, ^d porcentaje sobre células $B220^+$, ^e número absoluto de células en bazo ($\times 10^6$).

		Células $B220^+$			
		Porcentaje ^d		Número ($\times 10^6$) ^e	
		50% $Dicer^{fl/+}$	50% $Dicer^{fl/fl}$	50% $Dicer^{fl/+}$	50% $Dicer^{fl/fl}$
Transicionales ^a	Media	10.8	13.5	2.0	2.4
	Desviación Estándar	1.0	1.5	0.4	0.5
	p valor	0.0470		0.2778	
Foliculares ^b	Media	55.8	55.6	10.3	9.8
	Desviación Estándar	3.2	2.2	2.8	1.2
	p valor	0.9340		0.7617	
Zona Marginal ^c	Media	7.0	9.4	1.3	1.6
	Desviación Estándar	0.7	2.4	0.3	0.3
	p valor	0.1679		0.2246	

Tabla 4 - Porcentaje y número absoluto de células B CD45.2⁺ transicionales, foliculares y de zona marginal en quimeras mixtas

^a Células B transicionales B220⁺ CD45.2⁺ CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁺, ^b células B foliculares B220⁺ CD45.2⁺ CD21⁺ CD23⁺⁺ CD93⁺, ^c células B de zona marginal B220⁺ CD45.2⁺ CD21⁺⁺ CD23⁺, ^d porcentaje sobre células de B220⁺ CD45.2⁺, ^e número absoluto de células en bazo (x 10⁶).

		Células B220 ⁺ CD45.2 ⁺			
		Porcentaje ^d		Número (x 10 ⁶) ^e	
		50% Dicer ^{fl/+}	50% Dicer ^{fl/fl}	50% Dicer ^{fl/+}	50% Dicer ^{fl/fl}
Transicionales ^a	Media	6.8	21.8	1.6	1.8
	Desviación Estándar	1.0	2.4	0.4	0.3
	p valor	0.0002		0.6256	
Foliculares ^b	Media	60.6	34.9	6.7	1.3
	Desviación Estándar	3.5	2.6	2.1	0.1
	p valor	0.0001		0.0034	
Zona Marginal ^c	Media	8.7	13.8	0.9	0.6
	Desviación Estándar	1.5	2.7	0.3	0.2
	p valor	0.0319		0.1720	

Parte II: Identificación de miRNAs implicados en la diferenciación terminal de células B

Patrones de expresión de miRNAs en células B foliculares y de zona marginal

El fenotipo observado en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ demuestra que los miRNAs actúan como moduladores de la diferenciación terminal de células B y son esenciales para su correcta culminación. Para profundizar más en su mecanismo de actuación, quisimos determinar qué miRNAs particulares podrían estar participando en la toma de decisión del destino celular entre células B foliculares y de zona marginal. Para ello se aislaron estos dos subtipos celulares de bazo de animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, se extrajo el RNA y se marcó e hibridó en microarrays de miRNAs. En primer lugar y consistente con la ausencia de Dicer, encontramos una reducción global en los niveles de los miRNAs en células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ de ambos subtipos celulares (**Fig. 12a**). Para identificar miRNAs diferencialmente expresados entre células foliculares y de zona marginal comparamos los perfiles de expresión de estas dos subpoblaciones en animales control ($CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$), donde la generación de miRNAs maduros ocurre con normalidad. Para ello, se seleccionaron aquellos miRNAs con diferencias de expresión mayores de dos veces y significativas estadísticamente ($p < 0.1$) entre células foliculares y de zona marginal de animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$. Del análisis se obtuvieron 31 miRNAs que cumplían dichas condiciones (**Fig. 12a**). Para validar los datos del microarray se comprobaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de 4 de los 31 miRNAs seleccionados (miR141, miR16, miR192 y miR194). Los resultados con esta técnica fueron consistentes con los del microarray (**Fig. 12b**), lo que confirma la validez del análisis realizado. Es interesante mencionar que en animales control $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ los miRNAs diferencialmente expresados presentaban en todos los casos niveles más altos en células foliculares que en células de zona marginal (**Fig. 12a**). Este resultado es consistente con la mayor expresión de Dicer observada en células foliculares y parece indicar una vez más que la regulación mediada por miRNAs es crucial para su correcta diferenciación, mientras que la dependencia de las células de zona marginal es menos importante.

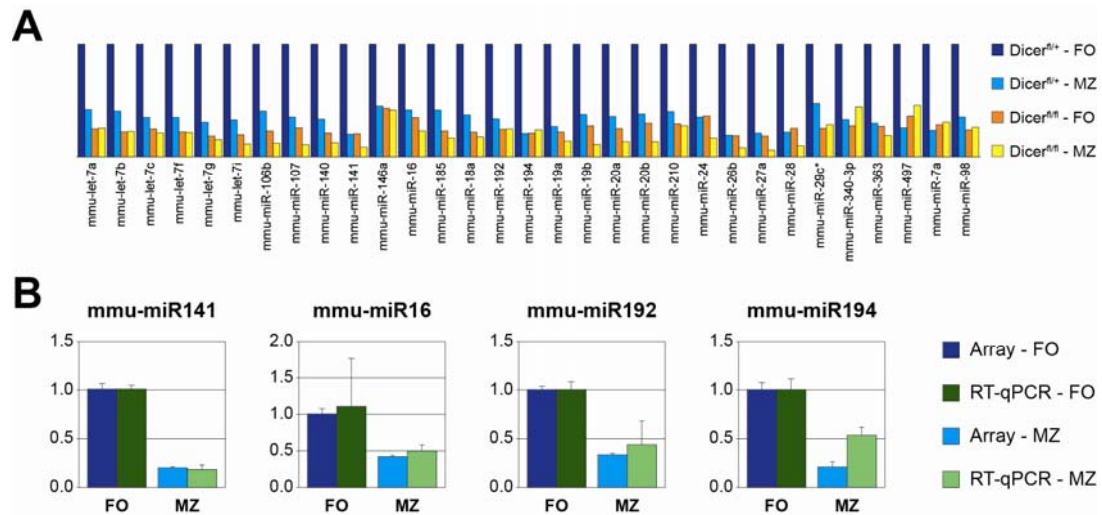


Figura 12 - Análisis de la expresión de miRNAs en subpoblaciones de células B

(A) Caracterización de los patrones de expresión de miRNAs en células B foliculares (FO) y de zona marginal (MZ). Las subpoblaciones fueron aisladas de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} por citometría de flujo. A continuación el RNA fue extraído, marcado e hibridado en microarrays de miRNAs. En la figura se muestran los niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados entre células control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}) de zona marginal (barras azul claro) y foliculares (barras azul oscuro) ($n=3$, $p<0.1$). Las barras representan la intensidad de fluorescencia de cada miRNA normalizada al valor en células foliculares CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}. Las barras naranjas y amarillas corresponden los valores obtenidos en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} foliculares y de zona marginal respectivamente. (B) Validación de los resultados obtenidos en el microarray por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} foliculares (FO) y de zona marginal (MZ) se aislaron y procesaron como se indicó en el apartado anterior y el RNA se utilizó para determinar la expresión de miR141, miR16, miR192 y miR194. Los datos se normalizaron a los niveles de expresión en células foliculares. En la figura se comparan los resultados obtenidos en el microarray para células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} foliculares (barras azul oscuro) y de zona marginal (barras azul claro) con los obtenidos por RT-qPCR para los mismos tipos celulares (FO, barras verde oscuro; MZ, verde claro).

Dianas de miRNAs en genes implicados en diferenciación terminal de células B

Los 31 miRNAs diferencialmente expresados entre células foliculares y de zona marginal fueron sometidos a un análisis bioinformático con el objetivo de encontrar dianas de estos miRNAs en mRNAs de genes implicados en la decisión del destino celular entre estos dos subtipos de células B. De este modo se quiso determinar si la desregulación de alguno de estos genes en ausencia de miRNAs podría ser responsable de las alteraciones poblacionales observadas en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. El análisis se realizó utilizando tres *softwares* de predicción independientes:

miRanda, *miRBase* y *TargetScan*. Con cada uno de ellos se determinaron las posibles dianas de los miRNAs seleccionados en los mRNAs de cuatro genes cuyo papel en la diferenciación terminal de células B está demostrado: Aiolos, Btk, CD21 y Notch2 (Cariappa et al., 2001; Kuroda et al., 2003; Saito et al., 2003; Wang et al., 1998) (Fig. 13a). miR185 fue el único miRNA encontrado por los tres *softwares* con capacidad para modular una de estas dianas. En particular se encontró que el mRNA de Btk es potencialmente regulable por miR185 a través de la interacción con los nucleótidos 17-38 de su 3'UTR (Fig. 13b). Este resultado sugiere un posible papel de miR185 en la regulación de los niveles de Btk que podría estar modulando la decisión de destino celular entre células foliculares y de zona marginal.

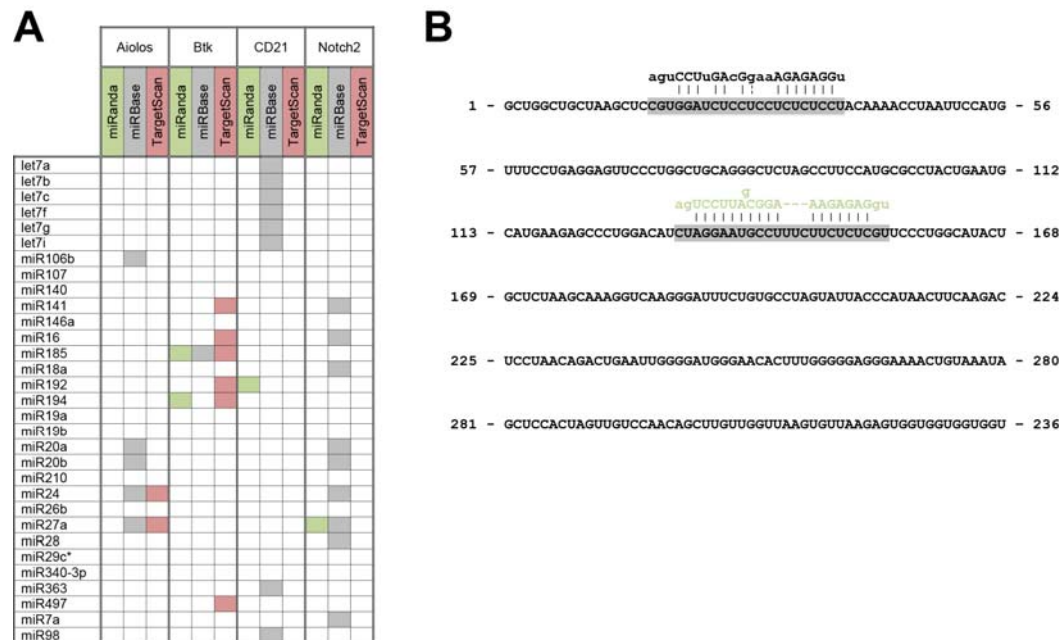


Figura 13 - Predicciones bioinformáticas

(A) Los miRNAs diferencialmente expresados en células B foliculares y de zona marginal mostrados en la figura R9 se sometieron a un análisis bioinformático de predicción de genes diana utilizando tres softwares: miRanda (verde), miRBase (gris) y TargetScan (rojo). La tabla muestra las predicciones obtenidas con cada miRNA para genes potencialmente implicados en el proceso de diferenciación de células foliculares frente a células de zona marginal (Aiolos, Btk, CD21 y Notch2). Los tres softwares utilizados predijeron Btk como diana de miR185. (B) Secuencia del 3'UTR de Btk. Las regiones sombreadas muestran los posibles sitios de unión de miR185 predichos y sobre ellas el alineamiento del miRNA. La primera región (de la posición 17 a la 38) se encontró como diana putativa de miR185 en las predicciones de los tres softwares, mientras que la segunda (de la posición 132 a la 156) se predijo únicamente en la aplicación miRanda.

Expresión de miR185 durante la diferenciación terminal de células B

Para analizar la regulación de la expresión de miR185 durante las últimas etapas de la diferenciación de las células B, se aislaron células B transicionales, de zona marginal y foliculares de bazo de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} y se cuantificaron mediante RT-qPCR los niveles de miR185. En células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} la expresión de miR185 se encuentra reducida un 30% en células de zona marginal e incrementada un 20% en foliculares, en comparación con los niveles observados en células transicionales (**Fig. 14**). Por otra parte, la expresión de miR185 se encontró reducida en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} de todos los subtipos, pero una vez más las células foliculares expresaron los niveles más altos del miRNA (**Fig. 14**). Estos resultados indican que la expresión de miR185 se encuentra regulada a lo largo de las últimas etapas de la diferenciación B. Además el aumento de los niveles de miR185 en células foliculares CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} indica de nuevo que aquellas células que mantienen cierta expresión de Dicer y, por ende, de miR185 son preferencialmente seleccionadas para formar parte del compartimento folicular.

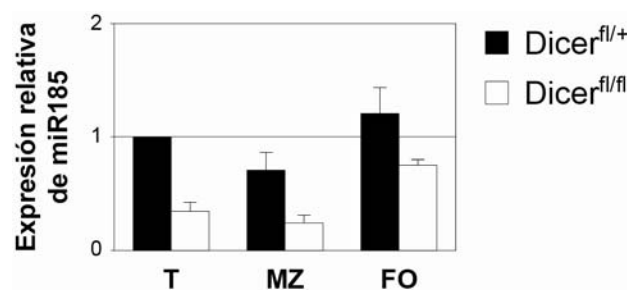


Figura 14 - Expresión de miR185 en subpoblaciones de células B

Expresión de miR185 en células B transicionales (T), de zona marginal (MZ) y foliculares (FO). Las poblaciones T, MZ y FO se aislaron de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (barras negras) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (barras blancas) por citometría de flujo preparativa de acuerdo a la expresión de los marcadores B220, CD21, CD23 y CD93. La expresión de miR185 se determinó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados se normalizaron a los valores obtenidos en células transicionales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}. Las barras de error representan la desviación estándar (T: n=3, p<0.01; MZ: n=3, p=0.03; FO: n=3, p=0.03).

Parte III: Regulación de la señalización a través del BCR por Btk y miR185

La intensidad de la señal a través del BCR controla diversos aspectos del desarrollo y función de las células B, incluyendo la decisión del destino celular entre células foliculares y de zona marginal (Grimaldi et al., 2005; Pillai and Cariappa, 2009). La quinasa Btk forma parte de la ruta de señalización del BCR, participando en el establecimiento de los umbrales de activación de esta vía y se ha sugerido que actúa favoreciendo la diferenciación de las células de zona marginal y el reclutamiento de células autorreactivas a este compartimento (Halcomb et al., 2008; Khan et al., 1995; Martin and Kearney, 2000; Ng et al., 2004; Satterthwaite et al., 1997). La predicción de Btk como posible diana de miR185 sugiere que este miRNA podría ser responsable de la regulación de la expresión Btk y controlar de este modo el destino celular de las células transicionales. En animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} la ausencia de miR185 resultaría en un incremento en los niveles de Btk que desregularían el proceso de diferenciación, favoreciendo la generación de células de zona marginal en detrimento de las células foliculares. Para explorar esta hipótesis se realizó una serie de experimentos que se detallan a continuación.

miR185 reduce los niveles de expresión de Btk

En primer lugar se quiso determinar si miR185 era realmente capaz de regular los niveles de expresión de Btk. Para ello se cultivaron células B de bazo de animales *wild type* en condiciones de activación con LPS e IL4 y se transdujeron retroviralmente con vectores que expresan GFP junto con miR185 o miR27a, este último como miRNA control sin dianas predichas en el 3'UTR de Btk (**Fig. 13**). Como control negativo adicional se usó el vector vacío (ver **figura 27**, en el apartado de materiales y métodos). 72 horas después de la transducción se aislaron las células transducidas GFP⁺ mediante citometría de flujo preparativa y se determinaron los niveles de expresión de Btk mediante RT-qPCR. Para evaluar la especificidad del efecto, se midieron también los niveles de un mRNA cuya secuencia no está predicha como diana de miR185 (Dicer). miR185 fue capaz de reducir la expresión de Btk

entorno a un 40% en relación a los niveles observados en las células transducidas con el vector vacío (**Fig. 15**). Este efecto es específico de miR185, ya que no se observó en la sobreexpresión de miR27a, y particular de Btk, pues ninguno de los dos miRNAs fue capaz de reducir la expresión de un mRNA no relacionado, como es Dicer (**Fig. 15**).

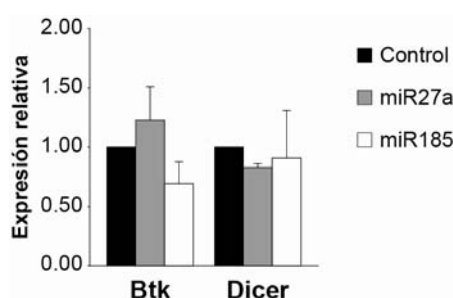


Figura 15 - La sobreexpresión de miR185 reduce los niveles de Btk

Los miRNAs miR185, miR27a y una construcción control se transdujeron retroviralmente en células B primarias de bazo de ratones wild type en presencia de LPS e IL4. Dos días después, las células transducidas GFP⁺ se aislaron por citometría de flujo preparativa, se extrajo el RNA y los niveles de expresión de Btk se determinaron por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los niveles de mensajero de Dicer de las mismas muestras fueron utilizados como control negativo. Las barras representan los niveles de mRNA normalizados a la expresión de GAPDH y relativos a los valores obtenidos en células transducidas con la construcción control (control vs miR185: Btk, n=4, p<0.01; Dicer, n=4, p=0.73).

Expresión de Btk en células B deficientes para Dicer

La confirmación de que el mRNA de Btk es una diana de miR185 está de acuerdo con la hipótesis de la desregulación de esta quinasa en células B de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, en los que la expresión de miR185 está comprometida (**Fig. 14**). En consecuencia, cabría esperar que los niveles de Btk estuvieran aumentados en ausencia de Dicer. Encontramos que éste era efectivamente el caso. Se aislaron células B totales de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} y se determinaron mediante *western blot* los niveles de Btk. Las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentaron un incremento de aproximadamente tres veces en la expresión de Btk (**Fig. 16a**).

Para descartar la posibilidad de que esta diferencia pudiera derivar de las

alteraciones poblacionales observadas en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, a continuación se analizaron los niveles de Btk en células transicionales, de zona marginal y foliculares de manera independiente. Para ello se marcaron células de bazo de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ con los marcadores de membrana correspondientes para la caracterización de las distintas poblaciones (B220, CD21, CD23 y CD93) e intracelularmente con anticuerpo anti-Btk y se analizaron por citometría de flujo. Mediante este análisis se confirmó el incremento en la expresión de Btk en las células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, particularmente en las poblaciones transicional y folicular (**Fig. 16b**). En células de zona marginal el aumento de Btk es leve y no significativo, posiblemente debido a que la técnica carece de sensibilidad suficiente como para detectar cambios de expresión pequeños. Es interesante que en células control $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ los niveles de Btk correlacionan de forma inversa con los de miR185 (**Fig. 14**), existiendo una mayor expresión de Btk en las células de zona marginal, donde los niveles de miR185 son menores, y una expresión reducida de Btk en células foliculares, donde los niveles de miR185 son más altos. La misma tendencia se observa en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$.

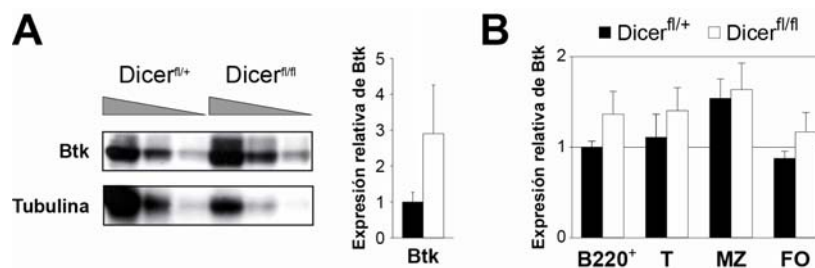


Figura 16 - Btk está sobreexpresado en células B de animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$

(A) Se analizaron lisados totales de células B de bazo de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ ($Dicer^{fl/+}$) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ ($Dicer^{fl/fl}$) por Western blot con anticuerpos anti-Btk y anti-tubulina. El gráfico muestra las cuantificaciones densitométricas de las bandas obtenidas en células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ (negro) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (blanco) normalizadas a la expresión de tubulina y relativas a los valores obtenidos en células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$. Las barras de error representan la desviación estándar (n=2, p<0.01). (B) Expresión de Btk en subpoblaciones de células B. Se marcaron células de bazo de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ (barras negras) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (barras blancas) en membrana con anticuerpos anti-B220, CD21, CD23 y CD93 e intracelularmente con anticuerpo anti-Btk y se analizaron por citometría de flujo. La gráfica representa la intensidad media de Btk en células B totales (B220⁺), transicionales (T), de zona marginal (MZ) y foliculares (FO). Los datos se normalizaron a la intensidad de fluorescencia en células B220⁺ de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ (B220⁺: n=8-10, p<0.01; T: n=8-10, p=0.02; MZ: n=8-10, p=0.41; FO: n=8-10, p<0.01).

Estos resultados confirman la existencia de una desregulación de Btk en células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} y además indican una correlación inversa con los niveles reducidos de miR185 observados en las distintas subpoblaciones.

Señalización a través del BCR en células B deficientes para Dicer

Para determinar si los niveles aumentados de Btk en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} resultaban en un incremento de su función, se estudió la capacidad de Btk para transducir la señalización a través del BCR, midiendo la eficiencia de la fosforilación de ERK, que se encuentra por debajo de Btk en la ruta. Para ello se aislaron células B de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, se estimularon con anti-IgM y posteriormente se analizaron los niveles de ERK total y fosforilado mediante *western blot*. La fosforilación de ERK fue más intensa en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} que en células control CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}, tanto antes como después de la estimulación (Fig. 17). Este dato indica que la señalización a través del BCR es más fuerte en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} y que éstas presentan además un cierto grado de activación basal incluso en ausencia de estímulo.

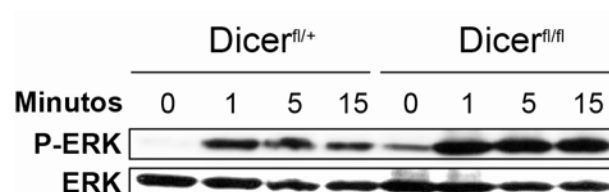


Figura 17 - La fosforilación de ERK es más eficiente en células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Se estimularon células B totales de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}) con anti-IgM y analizadas por Western blot con anticuerpo anti-ERK total (ERK) y anti-ERK fosforilado (P-ERK). El número sobre cada carril indica los minutos transcurridos de estimulación.

A continuación se analizó un evento posterior a la activación del BCR pero dependiente de ésta, como es la recombinación de cambio de isotipo. Para ello se cultivaron células B de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} en presencia de anti-IgM e IL4 y se determinó mediante citometría de flujo el

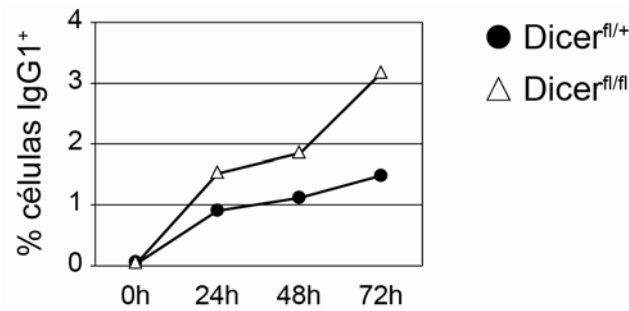


Figura 18 - El cambio de isotipo es más eficiente en células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Estimulación de células B de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (círculos negros) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (triángulos blancos). Las células se cultivaron en condiciones de activación con anti-IgM e IL4 y posteriormente se marcaron con anticuerpo anti-IgG para su análisis por citometría de flujo a los tiempos indicados. Las cinéticas representan el porcentaje de células IgG1⁺ en los diferentes puntos de análisis (72 horas: n = 3, p=0.02).

porcentaje de células IgG1⁺ a diferentes tiempos. Las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentaron una mayor eficiencia de cambio de isotipo que las células control CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} que empieza a observarse en momentos tempranos del cultivo y se acentúa a las 72 horas (**Fig. 18**).

Finalmente se quiso analizar la función del BCR en un contexto fisiológico, como son las placas de Peyer. Las células B presentes en este tejido reciben señales constitutivas de activación que resultan en la formación de células de centro germinal y el cambio de isotipo a IgA. Se ha sugerido que la generación y expansión de estas células está estimulada por señales procedentes de la interacción de antígenos de la flora bacteriana con el BCR (Rhee et al., 2005). Por este motivo se analizaron las placas de Peyer de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} por citometría de flujo. Encontramos que el porcentaje de células de centro germinal (Fas⁺ GL7⁺) y la eficiencia de cambio de isotipo (IgA⁺) estaban incrementados aproximadamente dos veces en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (**Fig. 19a y b**, respectivamente).

Todos estos resultados demuestran que las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan una hiperactivación de la ruta de señalización del BCR, que a nivel funcional se refleja en un aumento en la fosforilación de ERK, un incremento de la eficiencia de cambio de isotipo y una acumulación de células de centro germinal en placas de Peyer.

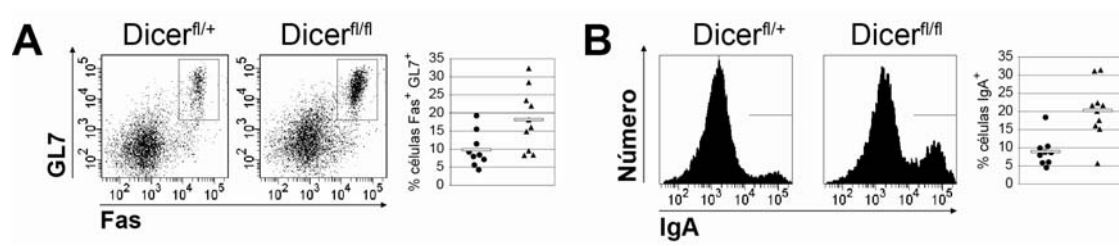


Figura 19 - Las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} en placas de Peyer están hiperactivadas

Análisis de la población B en placas de Peyer de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}). Las suspensiones celulares se marcaron con los anticuerpos indicados y se analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen diagramas representativos de los análisis citométricos sobre células CD19+. Los gráficos a la derecha muestran el porcentaje sobre células B (CD19+) de células de centro germinal Fas⁺ GL7⁺ (A) y células IgA⁺ (B). Cada punto en el gráfico corresponde a un solo animal, los círculos representan a los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y los triángulos a los CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La barra horizontal muestra la media de los valores (Fas⁺ GL7⁺: n=9-10, p=0.02; IgA⁺: n=9-10, p<0.01).

La sobreexpresión de Btk reproduce el fenotipo de las células deficientes para Dicer

Posteriormente se quiso determinar si la modulación de los niveles de expresión de Btk era suficiente para alterar la señalización del BCR. Para ello se cultivaron células B de ratones *wild type* con anti-IgM e IL4 y se transdujeron retroviralmente con construcciones que permiten la sobreexpresión de Btk (pMXPIE-Btk), miR185 (pmiRNA-miR185) y el correspondiente vector vacío como control en cada caso (pMXPIE-vacío o pmiRNA-vacío) (ver **figura 27**, en el apartado de materiales y métodos). 96 horas después de la transducción se analizó la eficiencia de cambio de isotipo a IgG1 en células transducidas GFP⁺ mediante citometría de flujo. Los resultados indican que la sobreexpresión de Btk es suficiente para aumentar el porcentaje de células IgG1⁺ (**Fig. 20**), emulando el fenotipo observado en células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (**Fig. 18**) en las que los niveles de Btk están incrementados. Del mismo modo, la sobreexpresión de miR185 que, como se mostró anteriormente, reduce los niveles de Btk (**Fig. 15**), resulta en una eficiencia menor de cambio de isotipo (**Fig. 20**).

En conjunto, estos resultados demuestran la implicación de miR185 en el control de los niveles de Btk, que a su vez modulan la intensidad de la señal a través

del BCR. En células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} la pérdida de este sistema de regulación negativa de Btk a través de miR185 deriva en un incremento en la señalización del BCR.

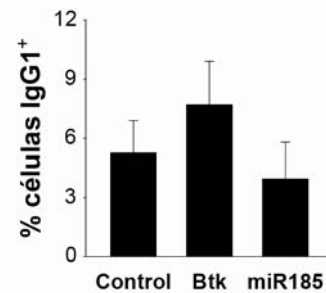


Figura 20 - Ensayos de ganancia de función de Btk y miR185

Btk y miR185 se transdujeron retroviralmente en células B primarias de bazo de ratones wild type en presencia de anti-IgM e IL4. La eficiencia de cambio de isotipo a IgG1 se analizó por citometría de flujo 96 horas después de la transducción. El gráfico representa el porcentaje de células IgG1⁺ sobre células transducidas GFP⁺. Las barras de error muestran las desviaciones estándar (n=3, p=0.03).

Parte IV: Repertorio de IgH, autoanticuerpos y autoinmunidad

Repertorio de anticuerpos

El incremento de la señalización a través del BCR observado en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} podría potencialmente afectar el proceso de selección del repertorio de anticuerpos. Para comprobar si la ausencia de Dicer podía dar lugar a un sesgo en el repertorio de anticuerpos, se analizaron los reordenamientos V(D)J de cadena pesada de las inmunoglobulinas expresadas en bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Para ello los reordenamientos se amplificaron mediante RT-PCR, se clonaron y secuenciaron y se analizaron con la aplicación *IgBLAST* (Tabla 5). Este análisis permite obtener una muestra del repertorio de IgH. No se observaron diferencias significativas en el uso de elementos D_H (Fig. 21a y Tabla 5). Sin embargo

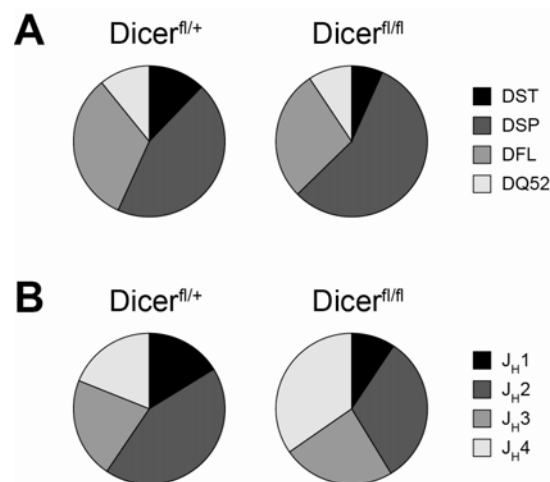


Figura 21 - Repertorio de IgH en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Análisis del repertorio expresado de IgH. Las células B se aislaron de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Posteriormente se extrajo el RNA, se retrotranscribió y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos de las regiones V_H7183 y V_H558 en combinación con otro oligonucleótido que hibrida con la región constante C_μ (ver figura 28, en el apartado de materiales y métodos). Los productos de PCR se clonaron, secuenciaron y analizaron usando el software *IgBLAST*. Los sectores representan la contribución de las distintas familias D_H (A) y de los segmentos J_H (B) para células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}). Los resultados incluyen los datos obtenidos en cuatro animales de cada genotipo (D_H: n=74-75, P=0.10, J_H: n=74-75, p<0.01). El análisis completo de las secuencias se encuentra en la tabla 5.

Tabla 5 - Análisis del repertorio de IgH

^a Secuencia de la región CDR3, ^b Número de argininas (R) y lisinas (K) dentro de la región CDR3.

CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/+}					CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/fl}				
Clon	DH	JH	CDR3 ^a	R+K ^b	Clon	DH	JH	CDR3 ^a	R+K ^b
53A1	DSP	3	PSMVPL	0	55A1	DQ52	3	GQLTGT	0
53A2	DSP	3	SPYQLA	0	55A2	DSP	3	SPYDGY	0
53A3	DFL	1	PEYYGSSLLG	0	55A3	DSP	3	RDYD	1
53A4	DSP	3	EGYGKG	1	55A4	DSP	1	SRIYYDYDA	1
53A5	DSP	4	DKGVITTTGGH	1	55A5	DSP	4	PYDYH	0
53A6	DQ52	2	LTGT	0	55A6	DFL	1	QAHYYGSRGG	1
53A7	DSP	1	HGDGNG	0	55A7	DSP	2	GRGWGN	1
53A8	DSP	2	VYDGYAY	0	55A8	DSP	4	RSTMITTL	1
53A9	DSP	3	GEKDFYP	1	55A9	DFL	2	SIYYGSRA	1
53A10	DQ52	1	PYLGR	1	55A10	DQ52	3	SNWDG	0
52A1	DSP	4	SYDYDDGS	0	56A1	DSP	2	HAGTGGD	0
52A2	DST	2	GTRG	1	56A2	DSP	3	QGLRG	1
52A3	DFL	4	QREITYYGSSYED	1	56A3	DQ52	4	LGRE	1
52A4	DST	3	SG	0	56A4	DFL	2	HRTPGSSF	1
52A5	DST	4	TETAQATR	1	56A5	DSP	3	SFYDY	0
52A6	DFL	2	SYYGSSY	0	56A6	DSP	4	SGNYVT	0
52A7	DFL	2	DTTVV	0	56A7	DST	4	GVPH	0
52A8	DSP	4	RG	1	56A8	DFL	2	HTV	0
52A9	DQ52	1	SGGPL	0	56A9	DSP	1	QGG	0
52A10	DSP	3	HDYD	0	56A10	DFL	4	TFYGP	0
50A1	DQ52	3	DSRDGTR	2	54A1	DSP	2	HGN	0
50A2	DSP	2	SGRYDL	1	54A2	DSP	3	GYRYDE	1
50A3	DSP	4	TYYSKG	1	54A3	DSP	2	GYGN	0
50A4	DFL	2	EGLRLI	1	54A4	DFL	1	HYYGSS	0
50A5	DFL	1	YYYGSSYVG	0	54A5	DSP	2	RGNYED	1
50A6	DFL	2	GYGSSY	0	54A6	DSP	2	DGN	0
50A7	DFL	2	DYYGSF	0	54A7	DSP	3	SRIYGP	1
50A8	DST	2	EGTPN	0	54A8	DFL	3	GLGVRL	1
50A9	DFL	1	PYGSSYD	0	54A9	DSP	4	QGGLRRVS	2
50A10	DFL	4	HEGG	0	54A10	DFL	4	RYVE	1
48A1	DFL	2	LTTVVA	0	51A1	DSP	4	HGDYDG	0
48A2	DQ52	1	HPELGRG	1	51A2	DQ52	3	TN	0
48A3	DSP	4	IEGNYN	0	51A3	DSP	4	LMGTGYDGED	0
48A4	DSP	3	EGVYDYG	0	51A4	DSP	4	DYRG	1
48A5	DFL	2	GVYYYG	0	51A5	DSP	1	RYGYDD	1
48A6	DFL	3	SLLLRHGFKG	2	54B1	DQ52	2	RLGP	1
53B1	DST	2	SERG	1	54B2	DQ52	2	GGD	0
53B2	DST	3	KDSSGYVG	1	54B3	DSP	4	SYDYD	0
53B3	DQ52	2	VGLTL	0	54B4	DQ52	2	RGT	1
53B4	DSP	4	RGDYRYDDG	2	54B5	DSP	2	SVRRY	2
53B5	DSP	4	SYGNFY	0	54B6	DSP	3	GDYDYGDP	0
53B6	DST	3	EGSSGS	0	54B7	DSP	4	TNYR	1
53B7	DFL	2	MTTAT	0	54B8	DSP	3	YGNYE	0
53B8	DFL	2	RSYGYD	1	54B9	DSP	2	RTM	1
53B9	DSP	2	SRDYG	1	54B10	DST	4	RQLGLP	1
53B10	DSP	2	SWDGFY	0	55B1	DFL	3	DDYYGSRS	1
52B1	DSP	2	TYSNYGG	0	55B2	DFL	2	RTG	1
52B2	DFL	2	SVHYGV	0	55B3	DST	2	SGSSGYVG	0
52B3	DSP	2	RDSNYGF	1	55B4	DFL	4	RGS	1
52B4	DST	2	SGTV	0	55B5	DST	4	GELSRPRLGLQD	2
52B5	DST	2	GGSSGYGGY	0	55B6	DSP	2	GGVTTVP	0
52B6	DSP	3	RSEGNYS	1	55B7	DSP	2	ARLGLF	1
52B7	DSP	1	RIYYGN	1	55B8	DSP	4	VTRYGYDPR	2
52B8	DSP	2	DGNP	0	55B9	DFL	4	SGFYGYD	0
52B9	DSP	3	EGGNS	0	55B10	DFL	3	LTTATTP	0
48B1	DSP	2	ASKNYSPL	1	56B1	DFL	4	GGSSYR	1
48B2	DFL	2	LNYGH	0	56B2	DSP	3	TIPGG	0
48B3	DSP	2	LEMVKN	1	56B3	DFL	4	SNYYGSS	0
48B4	DFL	1	ARWYYGSPS	1	56B4	DSP	2	WYYRY	1
48B5	DQ52	2	SSGT	0	56B5	DFL	4	REVVATY	1
48B6	DFL	3	STTVVEPS	0	56B6	DSP	2	EGWLLH	0
48B7	DSP	4	SYGNS	0	56B7	DSP	4	HRGYED	1
48B8	DFL	1	YYGSS	0	56B8	DFL	3	KTLLRLQ	2
48B9	DFL	2	YYYGSSL	0	56B9	DFL	4	TVLLD	0
48B10	DSP	2	RDGMY	1	56B10	DFL	4	WDYYGSSLH	0
50B2	DSP	4	GGIYYDYD	0	51B1	DSP	1	KGTGYV	1
50B3	DSP	1	AVTTSR	1	51B2	DSP	4	QG	0
50B4	DFL	3	TGSSS	0	51B3	DSP	4	GGVRG	1
50B5	DFL	3	GGSIITASG	0	51B4	DSP	3	SLYGTHEG	0
50B6	DSP	4	PIYP	0	51B5	DST	2	GTGR	1
50B7	DQ52	4	LGAGTGS	0	51B6	DFL	3	RLRGR	3
50B8	DFL	1	LYYGSL	0	51B7	DSP	1	SFYDGYPRG	1
50B9	DSP	2	GDYRYDVS	1	51B8	DSP	2	SMIT	0
50B10	DSP	2	KGG	1	51B9	DFL	2	VHYYGYS	0
					51B10	DSP	2	WGMIRN	1

sí se encontraron alteraciones en la utilización de los segmentos J_H , con un incremento en la proporción de J_H4 en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (15.8% vs 37.5%) (Fig. 21b y Tabla 5). A continuación analizamos las regiones CDR3 en los genes secuenciados. En estas regiones de las cadenas IgH de los anticuerpos se concentra la mayor variabilidad clonotípica y por ello juegan un papel esencial en la interacción con el antígeno. Está establecido que la acumulación de cargas positivas en el CDR3 está fuertemente asociada con la presencia de autorreactividad (Barbas et al., 1995; Crouzier et al., 1995; Ichiyoshi and Casali, 1994; Klonowski et al., 1999; Wardemann et al., 2003), presumiblemente porque favorecen la interacción con ácidos nucleicos y otros componentes celulares cargados negativamente. El análisis de las secuencias mostró que los CDR3 de las cadenas IgH expresadas en células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ presentaban un mayor número de cargas positivas, con un 53% de clones que contenían lisinas y argininas frente al 39% en animales control ($CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$) (Fig. 22 y Tabla 5). Entre ellas, la proporción de reordenamientos que contienen más

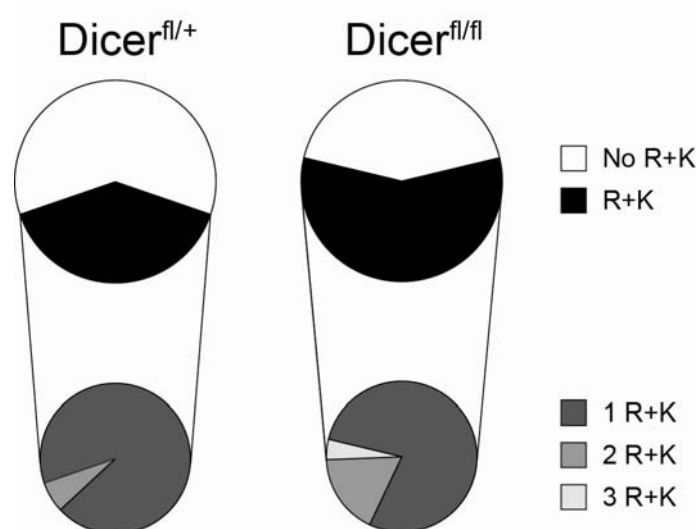


Figura 22 - Cargas positivas en la región CDR3 de IgH

Análisis del repertorio expresado de IgH. Las células B se aislaron de bazo de ratones $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ ($Dicer^{fl/+}$) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ ($Dicer^{fl/fl}$). Posteriormente se extrajo el RNA, se retrotranscribió y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos de las regiones VH7183 y VHJ558 en combinación con otro oligonucleótido que hibrida con la región constante $C\mu$ (ver figura 28, en el apartado de materiales y métodos). Los productos de PCR se clonaron, secuenciaron y analizaron usando el software IgBLAST. Los sectores muestran la presencia de argininas (R) o lisinas (K) (aminoácidos cargados positivamente) en la región CDR3 del locus de IgH. Los gráficos superiores representan el porcentaje de secuencias sin cargas positivas (sector blanco) o con cargas positivas (sector negro) en la región CDR3. Los sectores inferiores representan el porcentaje de secuencias con 1, 2 ó 3 cargas positivas en la región CDR3. Los resultados incluyen los datos obtenidos en cuatro animales de cada genotipo ($n=74-75$, $p=0.03$). El análisis completo de las secuencias se encuentra en la tabla 5.

de una carga positiva es también mayor en células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (6.6% vs 21.7%). Estos resultados indican un sesgo en el repertorio de anticuerpos en ausencia de Dicer.

Anticuerpos autorreactivos

La presencia de aminoácidos cargados positivamente en la región CDR3 es característica de anticuerpos autorreactivos, por este motivo se quiso determinar si las alteraciones en el repertorio observadas en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} correlacionaban con un incremento en los títulos de autoanticuerpos. Para ello se obtuvo suero de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} de entre 40 y 60

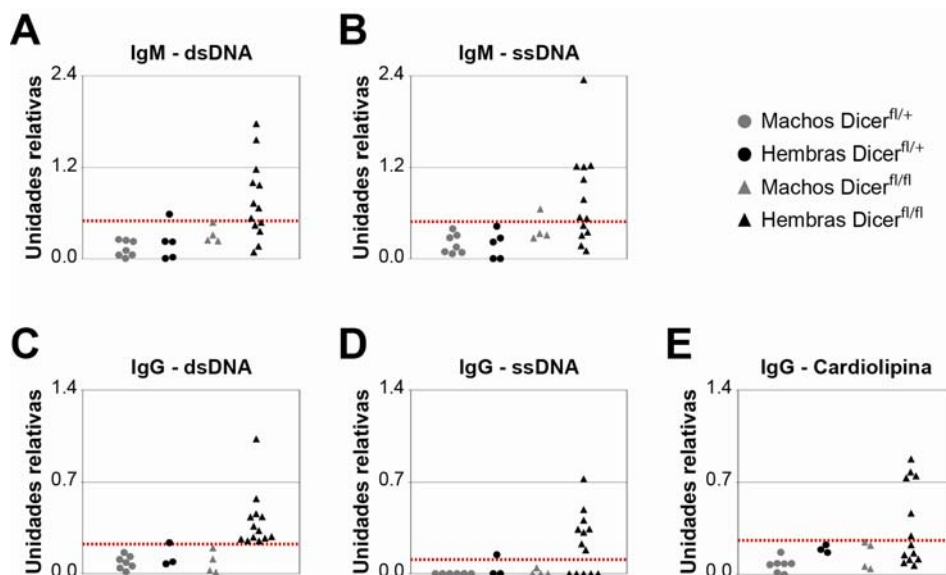


Figura 23 - Autoanticuerpos en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Análisis de los títulos de anticuerpos autoreactivos en suero. Los sueros se obtuvieron de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (círculos) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (triángulos) de entre 40 y 60 semanas de edad. La presencia de autoanticuerpos IgM (A y B) e IgG (C - D) se determinó por ELISA usando como antígenos DNA de doble cadena (dsDNA, A y C), DNA de cadena sencilla (ssDNA, B y D) y cardiolipina (E). Los resultados están representados como unidades colorimétricas relativas. A la señal de cada muestra se sustrajo el valor obtenido en suero de animales RAG^{-/-} (control negativo) y se normalizó a la señal de ratones MRL^{lpr/lpr}. Los resultados obtenidos en machos (gris) y hembras (negro) están representados por separado. Se estableció un umbral de autoreactividad igual al valor medio obtenido en los animales control CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} más dos desviaciones estándar (línea de puntos). Los sueros con valores por encima de ese umbral se consideraron autoreactivos contra el antígeno indicado en cada caso (control vs hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}: A, p=0.01; B, p<0.01; C, p<0.01; D, p=0.03; E, p=0.02).

semanas y se analizó por ELISA la presencia de anticuerpos IgM (Fig. 23a y b) e IgG (Fig. 23c, d y e) con reactividad contra tres autoantígenos: DNA de cadena doble (dsDNA, del inglés, *double stranded DNA*) (Fig. 23a y c), DNA de cadena sencilla (ssDNA, del inglés, *single stranded DNA*) (Fig. 23b y d) y cardiolipina (Fig. 23e). Las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentaron títulos de anticuerpos contra los tres autoantígenos indicados incrementados entre dos y cuatro veces (Fig. 23). Por el contrario, en machos CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} los títulos observados resultaron ser indistinguibles de los de los controles CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} de ambos sexos (Fig. 23).

Para descartar la posibilidad de que este resultado fuera debido a un incremento generalizado en la expresión de anticuerpos en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, se analizaron en los mismos sueros los títulos de anticuerpos IgM e IgG totales. Aunque se encontró un aumento leve en la concentración de inmunoglobulinas IgM e IgG en los sueros de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (datos no mostrados), no se observó correlación entre estos títulos y los de autoanticuerpos (Fig. 24). Este resultado sugiere que la acumulación de anticuerpos autorreactivos en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} no es una consecuencia de unos niveles más altos de inmunoglobulinas totales, sino una alteración en el proceso de selección del repertorio de anticuerpos.

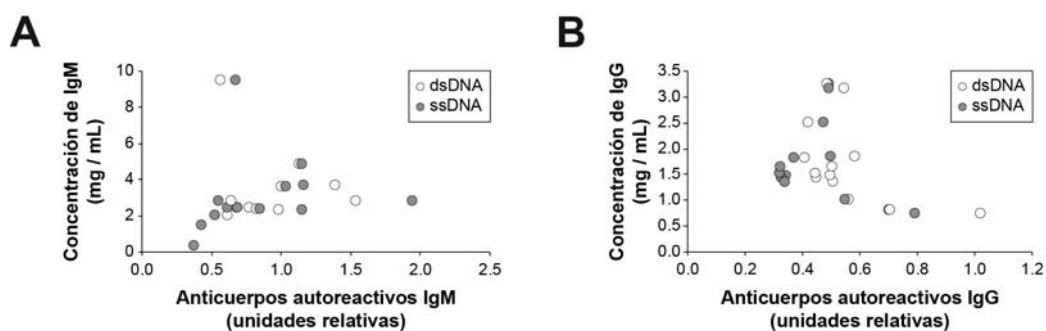


Figura 24 - Relación entre los títulos de inmunoglobulinas totales y de autoanticuerpos

Relación de los títulos de inmunoglobulinas totales frente a anticuerpos autoreactivos en suero de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} de entre 40 y 60 semanas de edad. Los gráficos muestran la concentración en suero de IgM (A) o IgG (B) frente a los títulos de anticuerpos autoreactivos IgM (A) o IgG (B) para DNA de doble cadena (dsDNA, círculos blancos) y DNA de cadena sencilla (ssDNA, círculos grises). Cada punto en el gráfico representa un animal (IgM: ssDNA, $R^2 < 0.01$; dsDNA, $R^2 = 0.03$; IgG: ssDNA, $R^2 < 0.01$; dsDNA, $R^2 = 0.08$).

Formación de inmunocomplejos en los glomérulos renales

En síndromes autoinmunes es habitual la acumulación de autoanticuerpos que forman inmunocomplejos en distintos tejidos, siendo especialmente frecuente su acumulación en el riñón. Estos inmunocomplejos a su vez desencadenan una respuesta inflamatoria patogénica que puede derivar en daño renal (Clynes et al., 2005; Clynes et al., 1998; Coxon et al., 2001). Por ello, para comprobar la patogenicidad de los autoanticuerpos generados en hembras $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de inmunocomplejos en cortes de riñón de animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ de entre 40 y 60 semanas. Las tinciones realizadas mostraron una importante acumulación de inmunoglobulinas IgG en los glomérulos renales de hembras $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ (**Fig. 25**), lo que indica la formación de inmunocomplejos. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el interior de los glomérulos demostró que la aparición de estos inmunocomplejos era unas tres veces más frecuente en hembras $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ que en hembras control ($CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$) (**Fig. 25**) y en machos de ambos genotipos. Estos resultados sugieren que la acumulación de anticuerpos autorreactivos en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ puede resultar en la formación de inmunocomplejos potencialmente patogénicos.

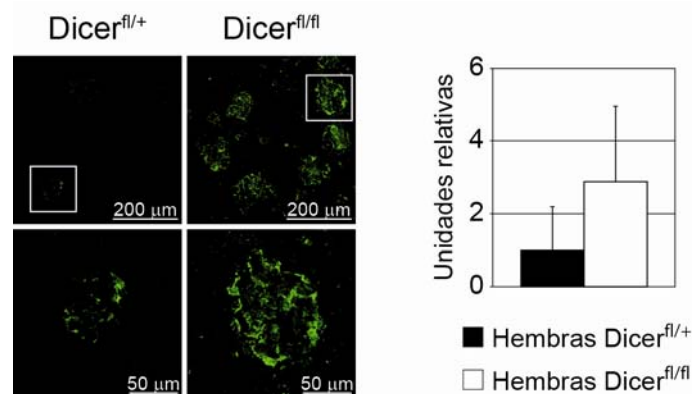


Figura 25 - Formación de inmunocomplejos en glomérulos renales

Análisis de la formación de inmunocomplejos en riñón. Se realizaron criocortes de riñón de hembras $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$ ($Dicer^{fl/+}$) y $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ ($Dicer^{fl/fl}$) de entre 40 y 60 semanas de edad y se tiñeron con anticuerpo anti-IgG. En la figura se muestran imágenes representativas con dos aumentos distintos (se incluye la escala en cada panel). La intensidad de fluorescencia de cada glomérulo se cuantificó usando el software LAS AF, se sustrajo la señal de fondo (tejido no glomerular) y se normalizó a la media de valores en los animales control $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}$. Los resultados de la cuantificación se muestran en el gráfico, las barras de error representan las desviaciones estándar ($p < 0.01$).

Patología renal

A continuación se quiso determinar si la acumulación de inmunocomplejos resultaba en la aparición de inflamación y daño en el tejido renal (glomerulonefritis). Para ello se realizaron cortes histológicos de riñón de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} de entre 40 y 60 semanas y se tiñeron con plata metenamina. En el análisis de las tinciones se consideraron principalmente dos parámetros característicos de glomerulonefritis: la infiltración de linfocitos y la alteración en la arquitectura de los glomérulos, particularmente el engrosamiento del espacio periglomerular. Para estimar de un modo cuantitativo el daño renal, se determinó el área periglomerular de entre 20 y 30 glomérulos por animal y se consideraron glomérulos afectados aquellos en los que esta superficie era significativamente mayor a la media de los riñones control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}). Las diez hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} analizadas mostraron una infiltración masiva de linfocitos, indicativa de un proceso inflamatorio, y el 50% de ellas presentaban además daños en la estructura glomerular con un mayor porcentaje de glomérulos afectados que las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Fig. 26).

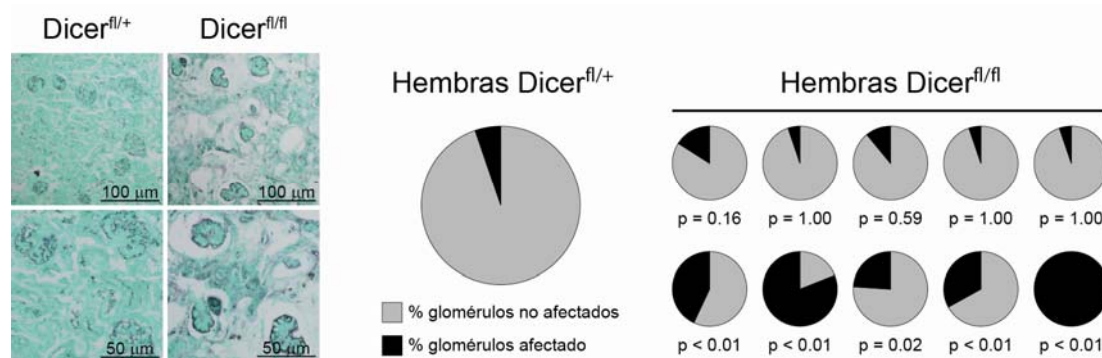


Figura 26 - Daño renal en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Análisis histológico de riñones de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} (Dicer^{fl/+}) y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} (Dicer^{fl/fl}) de entre 40 y 60 semanas de edad. Se realizaron cortes histológicos parafrinados de riñón y se tiñeron con plata metenamina (P.A.S.M.). En la figura se muestran imágenes representativas con dos aumentos distintos (se incluye la escala en cada panel). Para determinar el número de glomérulos dañados se cuantificó el área del espacio periglomerular usando el software ImageJ. Los gráficos representan el porcentaje de glomérulos no afectados (sector gris) frente al porcentaje de glomérulos afectados (sector negro) en un grupo de hembras control CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} e individualmente en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La mitad de las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} analizadas presentaban un mayor número de glomérulos dañados que las hembras control. Los p valores están calculados usando un test de Fisher para cada hembra CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} frente al conjunto de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}.

En resumen, estos resultados demuestran que la deficiencia en la expresión de miRNAs en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} no sólo afecta a la selección del repertorio de anticuerpos y a la generación de especies autorreactivas, sino que también puede promover el desarrollo de síntomas asociados a enfermedades autoinmunes como son la acumulación de inmunocomplejos en glomérulos y la aparición lesiones renales.

Discusión

Deleción de Dicer en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

En este trabajo se ha estudiado el papel que juegan los miRNAs en la diferenciación terminal de células B. Para abordar esta cuestión hemos generado animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, deficientes para la endonucleasa Dicer de manera tejida específica en células B.

En un trabajo previo, el laboratorio de Klaus Rajewsky utilizó un modelo similar de deleción de Dicer en células B en el que el gen de la recombinasa Cre se encontraba bajo las secuencias reguladoras de mb1 (mb1-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}) (Koralov et al., 2008). Este marcador se expresa en los estadios más inmaduros de la diferenciación del linaje B en médula ósea, lo que resulta en una deleción temprana de Dicer que tiene efectos dramáticos en la generación de células B. Los animales mb1-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan un bloqueo de la diferenciación en el estadio proB que impide totalmente la formación de células B inmaduras (Koralov et al., 2008). Este trabajo demostró un papel esencial de los miRNAs en la generación del linaje B pero, debido a la ausencia de células B maduras, el modelo no permite estudiar la contribución de los miRNAs en la diferenciación tardía y la función de las células B.

En nuestro modelo, la expresión de la recombinasa Cre está regulada por el marcador CD19, que aparece por primera vez en células proB en médula ósea. A partir de ese momento la recombinasa Cre podría potencialmente eliminar el gen de Dicer (Rickert et al., 1997). Sin embargo en los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} sólo las células B inmaduras presentan una bajada significativa en los niveles de mRNA de Dicer. Existen dos fenómenos que pueden explicar este retraso en la desaparición de Dicer. Por una parte, aunque la eliminación mediada por CD19-Cre puede comenzar en estadios muy tempranos, tiene lugar de forma gradual durante el desarrollo en médula ósea y se completa en la transición a células inmaduras (Hobeika et al., 2006; Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007). Por otra parte, una vida media prolongada del mRNA de Dicer podría dar cuenta de su persistencia (Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007). En consecuencia, la presencia de Dicer durante la diferenciación temprana en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} permite evadir el bloqueo del estadio proB observado en el modelo mb1-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} y por tanto hace posible el estudio de la contribución de los miRNAs en las últimas etapas del desarrollo de las células B.

Subpoblaciones de células B en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Al analizar los tejidos linfoides periféricos de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} observamos que la generación de células B maduras se encuentra comprometida, con una reducción de aproximadamente el 30% con respecto a la población B en animales control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}). Para profundizar más en las características de este fenotipo, se estudió la contribución de los distintos subtipos de células B y observamos que los ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan proporciones alteradas de los mismos, con un incremento porcentual de las poblaciones transicional y de zona marginal y en detrimento de la población folicular. Estas diferencias responden fundamentalmente a una importante reducción del número absoluto de células B foliculares, mientras que la generación de células transicionales y de zona marginal es normal en ausencia de Dicer. El fenotipo observado podría ser por tanto consecuencia de distintas alteraciones en la diferenciación o función de las células foliculares que se discuten a continuación.

Por una parte, los miRNAs son capaces de regular la inducción de apoptosis mediante distintos mecanismos que además pueden tener un efecto variable según el tipo celular del que se trate (Jovanovic and Hengartner, 2006). Por ejemplo, en los ratones mb1-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} el bloqueo de la diferenciación parece ser consecuencia de una mayor muerte celular en el estadio proB debida a la desregulación del factor pro-apoptótico Bim (Koralov et al., 2008). Por tanto, una posible explicación para la reducción en la población folicular en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} podría ser que la ausencia de Dicer estuviera comprometiendo de manera específica la viabilidad de estas células, de manera que éstas se generaran de forma normal pero desaparecieran después debido a muerte por apoptosis. En este sentido se puede señalar que algunos de los miRNAs identificados en células foliculares (como son miR19a, miR19b, miR20a, miR20b y miR106b) podrían, según una herramienta de predicción, regular negativamente el mRNA de Bim. Sin embargo, esta hipótesis es improbable ya que en los análisis histológicos y moleculares realizados en los bazo de estos animales, en los que se abordó también la posible implicación del factor Bim, no encontramos ninguna evidencia de una tasa mayor de muerte celular. Por este motivo, aunque no se puede descartar que la ausencia de miRNAs en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} pueda afectar a la viabilidad de las células B, este efecto, si existe, debe ser menor y no podría dar cuenta del fenotipo observado.

Otra posible explicación sería que la alteración en la proporción de las

poblaciones B no fuera una consecuencia directa de la ausencia de miRNAs, sino un efecto derivado de la generación deficiente de células B (linfopenia B). Esto podría explicarse mediante la existencia de un mecanismo homeostático compensatorio que favoreciera la diferenciación de una población competente de células de zona marginal para asegurar una primera barrera de protección rápida frente a infecciones, a expensas de la generación de células foliculares (Martin and Kearney, 2002). Para comprobar si éste era el caso se realizaron experimentos de reconstitución de médula ósea en condiciones de competición en los que se observó que las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} siguen presentando alteraciones poblacionales aún cuando la linfopenia B está compensada por la presencia de células *wild type*. Este resultado demuestra que el fenotipo observado en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} es autónomo de las células B y no un mecanismo homeostático derivado de la linfopenia B.

Por último, una tercera explicación que podría dar cuenta de la generación deficiente de células foliculares en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} es que uno o varios miRNAs estén regulando directamente los mecanismos que permiten la diferenciación terminal de células B, dando lugar a una alteración en las proporciones de las subpoblaciones B maduras. Las evidencias experimentales discutidas parecen descartar una contribución importante de las otras dos hipótesis, por lo que esta última es la que con mayor probabilidad puede dar cuenta del fenotipo de los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. La validez de esta hipótesis quedó posteriormente reforzada con el análisis de la expresión de Dicer y miRNAs y de la activación de células B, como se discutirá a continuación.

Dependencia de los miRNAs de células B foliculares

En este trabajo hemos encontrado una serie de evidencias que parecen indicar que la generación de células B foliculares es más dependiente de la expresión de miRNAs que la de células de zona marginal.

En primer lugar, los precursores CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} son capaces de generar números normales de células de zona marginal, sin embargo el número de células foliculares está dramáticamente reducido. Este fenotipo podría ser debido a que la delección del gen de Dicer no fuera completa hasta alcanzar el estadio folicular y que esto comprometiera la viabilidad de las células. No obstante, el análisis de la expresión de Dicer en las poblaciones B periféricas demostró que éste no era el caso:

las células foliculares de animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ presenta unos niveles de Dicer aproximadamente dos veces más altos que los de las células transicionales, lo que indica que el pico máximo de delección de Dicer ya ha ocurrido en un paso previo a la generación de células foliculares. Este resultado indica que únicamente aquellas células que retienen los niveles más altos de Dicer son seleccionadas para diferenciarse en células foliculares, lo que sugiere una mayor dependencia de esta población por los miRNAs.

Por otra parte, el estudio de los patrones de expresión de miRNAs en células *wild type* foliculares y de zona marginal nos permitió encontrar 31 miRNAs diferencialmente expresados entre los dos tipos celulares. Todos estos miRNAs, que podrían estar participando en el proceso de diferenciación, presentan unos niveles de expresión más altos en la población folicular que en la de zona marginal. De hecho, los niveles de expresión de miRNAs en células de zona marginal *wild type* son sólo ligeramente superiores a los de las células $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, lo que sugiere de nuevo que los requerimientos de miRNAs son distintos para estos dos linajes. El análisis de la cinética de expresión de Dicer en células B *wild type* transicionales, foliculares y de zona marginal mostró una vez más que la población folicular expresa unos niveles de Dicer mucho mayores que las células transicionales y de zona marginal. Este incremento puede dar cuenta de la sobrerrepresentación de miRNAs en células foliculares y es una evidencia más de la dependencia de las mismas por los miRNAs para su correcta diferenciación.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las alteraciones en las poblaciones de células B observadas en animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$ son debidas a una implicación directa de los miRNAs en el proceso de diferenciación, que actuarían fundamentalmente favoreciendo la generación de células B foliculares.

Regulación de Btk por miR185

Para tratar de dilucidar el mecanismo que diera cuenta del fenotipo de los animales $CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}$, examinamos con detalle los patrones de expresión de miRNAs en células B de zona marginal y foliculares. Partimos de la hipótesis de que alguno de los 31 miRNAs diferencialmente expresados entre estos dos tipos celulares podría estar implicado en la regulación del proceso de diferenciación. Para confirmarlo realizamos un análisis bioinformático en busca de posibles dianas de esos

miRNAs en mRNAs de genes cuya participación en la generación de células foliculares y de zona marginal estuviera documentada. De este modo encontramos que el mRNA de la quinasa Btk era una diana potencial de miR185.

Diversos trabajos han demostrado la participación de Btk en la toma de decisión del destino celular de células B maduras, presumiblemente mediante la modulación de la señalización a través del BCR (Halcomb et al., 2008; Khan et al., 1995; Martin and Kearney, 2000; Satterthwaite et al., 1997). Por este motivo consideramos interesante determinar si miR185 podía estar participando en este proceso mediante la regulación de los niveles de Btk.

En este sentido encontramos que 1) la sobreexpresión de miR185 es en sí misma capaz de reducir de manera específica los niveles de Btk, 2) que la expresión de este miRNA correlaciona de manera inversa con la de Btk en los distintos subtipos de células B, 3) que las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan un incremento global en la expresión de Btk que resulta en una señalización más fuerte a través del BCR y 4) que este fenotipo podía ser reproducido por la sobreexpresión de Btk.

Todas estas evidencias y la bibliografía citada nos permiten proponer un modelo de regulación coordinada de Btk y miR185 que permitiría la modulación del proceso de diferenciación de células B maduras mediante el control de los umbrales de señalización a través del BCR. Aquellas células con una expresión de miR185 más alta, presentarían una bajada en los niveles de Btk. Esto derivaría en una señalización más débil del BCR, que favorecería la diferenciación de células foliculares. De manera inversa, una expresión baja de miR185 permitiría la presencia de altos niveles de Btk, lo que conllevaría una señalización fuerte a través del BCR y la diferenciación en el compartimento de zona marginal. En el caso de las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, la ausencia de miR185 supone un incremento en la expresión de Btk lo que haría que prevaleciera la vía que conduce a la generación de células de zona marginal sobre la de células foliculares. De este modo el mecanismo propuesto en este trabajo puede dar cuenta de las deficiencias del compartimento folicular observadas en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}.

En conclusión, aunque no se puede descartar la existencia de otros mecanismos moleculares que pudieran estar contribuyendo al fenotipo de los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, nuestros resultados demuestran la implicación de miR185 y Btk en la determinación de destino celular de células B maduras mediante la modulación de la señalización a través del BCR.

Repertorio de anticuerpos y autorreactividad

Las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan un repertorio de anticuerpos alterado que afecta principalmente al uso de los segmentos J_H y a la presencia de cargas positivas en el CDR3. Este efecto tiene dos posibles lecturas: puede deberse a defectos en la recombinación V(D)J o derivar de alteraciones en el proceso de selección del repertorio durante los *checkpoints* de tolerancia. Como se discutió anteriormente, en la médula ósea de los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} la delección de Dicer es sólo evidente en células B inmaduras y no se encuentran afectados los estadios de diferenciación previos. Dado que la recombinación V(D)J de IgH se completa en células preB, la presencia de defectos en este proceso en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} es muy improbable. En la misma línea, tampoco tenemos evidencias de que las alteraciones en el repertorio se deban a defectos en el *checkpoint* de tolerancia central, ya que la proporción de células B inmaduras no está alterada en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. No obstante, sería necesario realizar un análisis de repertorio en distintos estadios de diferenciación de médula ósea para descartar por completo posibles alteraciones durante la recombinación V(D)J o en el establecimiento de la tolerancia central. Es más plausible en cambio que las alteraciones en el repertorio sean producto de fallos en los sistemas de selección periféricos. Además, dado que los *checkpoints* de tolerancia están gobernados por el BCR, esta hipótesis se ve reforzada por la señalización anormal que se observa en las células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} maduras debida a la desregulación de Btk.

Al analizar en detalle las características del repertorio de anticuerpos de los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, observamos un mayor porcentaje de regiones CDR3 que portaban lisinas y argininas. La presencia de estos aminoácidos cargados positivamente en el CDR3 es característica de anticuerpos autorreactivos (Barbas et al., 1995; Crouzier et al., 1995; Ichiyoshi and Casali, 1994; Klonowski et al., 1999; Wardemann et al., 2003), lo que sugiere que un proceso de selección anormal podría estar favoreciendo el mantenimiento de células B con especificidad por autoantígenos. Por otra parte, los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan también alteraciones en el uso de los elementos J_H, con un importante aumento en la utilización del segmento J_{H4}. No existe ninguna evidencia que apunte a la implicación de determinados elementos J_H en la formación de anticuerpos autorreactivos. Sin embargo, en modelos murinos de autoinmunidad sistémica mediante el análisis de repertorio de anticuerpos se ha encontrado un uso preferencial del segmento J_{H4} (Bloom et al., 1993; Duchosal et al., 1989; Losman et al., 1992; Shlomchik et al.,

1987), probablemente debido a fenómenos de recombinación secundaria (Klonowski and Monestier, 2000; Klonowski et al., 1999). Por ello, aunque el uso del segmento J_H4 no es característico de los autoanticuerpos, el aumento en su utilización observado en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} puede considerarse un indicio más de la presencia de alteraciones en el proceso de selección.

Las características observadas en los BCRs de células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} mediante el análisis del repertorio parecían ser indicativas de la presencia de anticuerpos autorreactivos en estos animales. La confirmación llegó al comprobar que sus sueros eran efectivamente reactivos contra distintos autoantígenos (dsDNA, ssDNA y cardiolipina). Este efecto sin embargo era exclusivo de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, mientras que los machos presentaban títulos de los autoanticuerpos indistinguibles de los encontrados en los animales control. La prevalencia sexual de este fenotipo se discutirá en el siguiente apartado.

Por último, es interesante considerar la posible implicación de las células de zona marginal en la generación de estos autoanticuerpos. Se ha demostrado que las células B con BCRs autorreactivos que no son seleccionadas negativamente, pasan a formar parte del compartimento de zona marginal (Li et al., 2002; Martin and Kearney, 2000). De este modo, un aumento en el número de células de zona marginal podría resultar en un incremento en los títulos de autoanticuerpos. En animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} el porcentaje de la población de zona marginal es mayor que en animales control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}), pero los números absolutos no varían. Por este motivo, no parece probable que el incremento en la proporción de las células de zona marginal pueda dar cuenta de la aparición de los autoanticuerpos en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. No obstante existe la posibilidad de que, debido a la desregulación de Btk las células CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presenten unos umbrales de selección mediados por el BCR más altos de lo normal de manera que una proporción de células que normalmente serían eliminadas por considerarse autorreactivas, pasarían a formar parte del compartimento de zona marginal. Para determinar si este es el caso sería necesario analizar el repertorio de anticuerpos de manera individual las distintas subpoblaciones de células B con el fin de determinar si las alteraciones observadas en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} son específicas de la población de zona marginal.

Autoinmunidad

Para comprobar si los autoanticuerpos presentes en hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} tenían relevancia fisiológica, se analizó la capacidad de los mismos de generar inmunocomplejos. La formación de inmunocomplejos es común en enfermedades autoinmunes y su acumulación en el riñón produce una respuesta inflamatoria que puede resultar en daño tisular. Mediante el análisis de los glomérulos renales encontramos que sólo las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan acumulación de inmunocomplejos y en el 50% de los casos evolucionan hacia una afección renal que resulta en daño tisular masivo, producto del proceso inflamatorio.

Este resultado indica que la aparición de la enfermedad autoinmune en este modelo es dependiente de la generación de autoanticuerpos. Cabría la posibilidad de que los títulos incrementados de anticuerpos autorreactivos fueran consecuencia de un aumento generalizado en la secreción de anticuerpos en células B de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. No obstante, esta alternativa es improbable ya que, aunque la concentración total de anticuerpos es ligeramente más alta en las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, estos títulos no correlacionan con los de anticuerpos autorreactivos. Por ello, nuestros datos son más consistentes con la idea de que el origen de estos autoanticuerpos es el fallo en los mecanismos de tolerancia periférica y que el leve aumento observado en la concentración total de anticuerpos es consecuencia del proceso inflamatorio en curso, como ocurre en distintos síndromes autoinmunes en los que es común un cierto grado de hipergammaglobulinemia.

Los desórdenes autoinmunes humanos que están ligados a células B suelen presentar una prevalencia mayor en mujeres que en hombres (Rider and Abdou, 2001; Whitacre, 2001). En nuestro caso, el modelo CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} también se observa esta tendencia, de forma que tanto la presencia de anticuerpos autorreactivos como los efectos patológicos de los mismos son exclusivos de hembras. Sin embargo, en las alteraciones observadas en el repertorio de anticuerpos no se observaron diferencias entre los dos sexos. Esto parece indicar que, aunque las deficiencias en el proceso de selección son comunes en hembras y machos y derivan presumiblemente de una señalización anormal a través del BCR, el desarrollo de la patología autoinmune es dependiente de un contexto hormonal concreto. Se ha demostrado que la señalización a través del receptor de estrógenos puede inducir la evasión de apoptosis y afectar a los mecanismos de tolerancia y a los umbrales de activación de células B (Grimaldi et al., 2002). Teniendo esto en cuenta, la explicación más

probable de la prevalencia sexual del fenotipo autoinmune en animales $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$ es que, en presencia un mismo repertorio de anticuerpos deficiente y con reactividad potencial contra autoantígenos, los niveles altos de estrógenos en hembras actuarían favoreciendo la supervivencia y la activación de las células B autorreactivas.

Existen trabajos en los que se han descrito varios miRNAs con dianas en los mRNAs de los componentes del receptor de estrógenos (Kondo et al., 2008; Pandey and Picard, 2009). Por tanto, cabe la posibilidad de que en células B $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$ la deficiencia de miRNAs resulte en un aumento de la expresión del receptor de estrógenos, que podría estar potencialmente favoreciendo la aparición del fenotipo autoinmune a través de los mecanismos anteriormente descritos. Aunque esta posibilidad no se ha abordado en este trabajo, las evidencias experimentales refuerzan la hipótesis de que el fenotipo de los animales $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$ aparece como consecuencia de una señalización del BCR anormal que en sí misma puede dar cuenta de las alteraciones poblacionales y los defectos en la tolerancia observados. Por ello, en el caso de existir una expresión aberrante del receptor de estrógenos en las células B $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$, ésta podría estar cooperando en el fenotipo pero es poco probable que actuara como elemento causante.

En conclusión, aunque no se puede descartar la presencia de otros factores implicados, el hecho de que las enfermedades autoinmunes ligadas a células B tengan una mayor prevalencia en mujeres que en hombres (Rider and Abdou, 2001; Whitacre, 2001) es suficiente para explicar las diferencias sexuales observadas en el fenotipo autoinmune de animales $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$. Esta susceptibilidad parece indicar que el desarrollo de la patología tanto en humanos (Castagnetta et al., 2002) como en ratones $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$ es dependiente de un contexto hormonal femenino que actuaría probablemente favoreciendo la supervivencia y activación de las células B autorreactivas.

Consideraciones finales

En este trabajo hemos demostrado que la presencia de miRNAs en células B es esencial para su correcta diferenciación y para la selección del repertorio de anticuerpos. Los defectos observados en el desarrollo de estos procesos biológicos en animales $CD19-Cre^{Ki/+}$ $Dicer^{fl/fl}$ son con gran probabilidad producto de un aumento en

la señalización a través del BCR debida a la desregulación de Btk en ausencia de miR185. Además en las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} existe una producción anormal de anticuerpos autorreactivos capaces de acumularse en el riñón y desarrollar una respuesta inflamatoria que en algunos casos resulta en daño tisular. Este fenotipo emula al de los pacientes de SLE, ya que en ambos casos existe una mayor prevalencia en el sexo femenino, presencia de autoanticuerpos contra antígenos del núcleo y afección renal. Por este motivo, podría ser interesante la utilización de este modelo como herramienta experimental que permitiera el desarrollo de esta patología y el estudio de factores que explicaran la prevalencia sexual en mujeres de los síndromes autoinmunes ligados a células B.

La sintomatología de SLE y otras enfermedades autoinmunes es enormemente heterogénea y esta variabilidad hace necesario el diseño de nuevos métodos de diagnóstico que permitan una mejor clasificación de estos pacientes de forma que se facilite la elección del procedimiento terapéutico más apropiado en cada caso particular (Dorner et al., 2009). Nuestros resultados evidencian un papel esencial de los miRNAs en el establecimiento de la tolerancia inmunológica y la prevención de repuestas autoinmunes. Por ello consideramos que el estudio de los patrones de expresión de miRNAs en células B podría representar una alternativa prometedora para la caracterización de pacientes con enfermedades autoinmunes, de potencial utilidad clínica para el diagnóstico y pronóstico de estas patologías.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La ausencia de miRNAs en animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} altera las proporciones de los distintos subtipos de células B maduras debido a una reducción drástica en el número de células B foliculares.
2. Este fenotipo observado en ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} se debe a defectos intrínsecos en la diferenciación terminal de células B maduras.
3. La expresión de la quinasa Btk está regulada por miR185.
4. En animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, el aumento de los niveles de Btk debido a la ausencia de miR185 conlleva un incremento en la señalización a través del BCR que puede dar cuenta de las proporciones alteradas en las poblaciones de células B maduras.
5. Las células B de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} presentan un repertorio de anticuerpos anormal con características autorreactivas.
6. Las hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} generan títulos altos de anticuerpos contra antígenos propios.
7. Los autoanticuerpos se acumulan en el riñón de hembras CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} formando inmunocomplejos capaces de iniciar una respuesta inflamatoria que en algunos casos resulta en daño renal.
8. Los miRNAs son esenciales durante las últimas etapas de la diferenciación B para la correcta generación de células B maduras y el establecimiento de la tolerancia inmunológica.

Materiales y métodos

Análisis fenotípico de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}

Animales

Los ratones deficientes condicionales para Dicer en células B se obtuvieron mediante el cruce de animales Dicer^{fl/fl} (Harfe et al., 2005) con ratones CD19-Cre^{Ki/+} (Rickert et al., 1997). Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo con las recomendaciones de la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias de Animales de Laboratorio (FELASA). Todos los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos del Comité de Bioética y Confort del Instituto de Salud Carlos III.

Obtención y procesamiento de muestras de tejidos linfoides

Los animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y D19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} se sacrificaron por hipoxia en cámara de CO₂ y posteriormente se extrajeron el bazo, los nódulos linfáticos inguinales, las placas de Peyer y los fémures. Los órganos se conservaron en hielo hasta su procesamiento en presencia de medio RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés, *Fetal Bovine Serum*) y los antibióticos penicilina (50 U/mL) y estreptomicina (50 µg/mL) (en adelante, RPMI completo). Los bazos, nódulos linfáticos y placas de Peyer se disgregaron sobre filtros de nylon de 70 µm de poro en RPMI completo y las suspensiones celulares obtenidas se centrifugaron (10' / 400 x g / 4°C). Las células de nódulos y placas de Peyer se resuspendieron en PBS 1X suplementado con 1% (v/v) FBS (en adelante, PBS 1X - 1% FBS). Las células de bazo se trataron con una solución de cloruro de amonio (*ACK Lysing Buffer, BioWhittaker*) durante 4 minutos a temperatura ambiente, para producir la lisis de los eritrocitos. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado con RPMI completo frío y la suspensión celular se centrifugó de nuevo (10' / 400 x g / 4°C), para posteriormente resuspender las células obtenidas en PBS 1X - 1% FBS. Por último, la médula ósea se obtuvo por perfusión con RPMI completo a través del conducto medular de los fémures. La suspensión celular obtenida se centrifugó, se trató para producir la lisis de eritrocitos, posteriormente se lavó con RPMI completo y se resuspendió en PBS 1X - 1% FBS del mismo modo que se describió para los bazos.

Análisis de poblaciones de células B por citometría de flujo

Para el análisis de poblaciones las células obtenidas de médula ósea, bazo, nódulos linfáticos y placas de Peyer se marcaron con anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos o biotinilados. Para cada marcaje 3×10^5 células se centrifugaron (5' / 400 x g / 4°C), se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS 1X - 1% FBS con la dilución y combinación de anticuerpos correspondiente según el caso. Las células se incubaron en hielo y protegidas de la luz durante 20 minutos, tras los cuales se lavaron con PBS 1X - 1% FBS y se centrifugaron de nuevo (5' / 400 x g / 4°C). En caso de utilizar anticuerpos directos, tras el lavado las células se resuspendieron en PBS 1X - 1% FBS para su análisis citométrico. En caso utilizar anticuerpos biotinilados que requirieran un segundo paso de marcaje, se repitió la incubación como se indicó anteriormente con la dilución de la estreptavidina conjugada a fluorocromo correspondiente en PBS 1X - 1% FBS. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X - 1% FBS, se centrifugó (5' / 400 x g / 4°C) y las células se resuspendieron en PBS 1X - 1% FBS. Los anticuerpos directos, indirectos y las estreptavidinas utilizadas se encuentran indicados en la **tabla 6**.

Tabla 6 - Anticuerpos para análisis citométricos

Anticuerpos conjugados a fluorocromo			Anticuerpos conjugados a biotina	
Anticuerpo	Compañía	Fluorocromo	Anticuerpo	Compañía
B220 (CD45R)	Miltenyi Biotec	VioBlue	CD43	BD Biosciences
CD21	BD Biosciences	FITC	CD23	BD Biosciences
CD5	BD Biosciences	FITC	IgG1	BD Biosciences
IgM	Caltag Laboratories	FITC	Estreptavidinas	
IgD	BD Biosciences	FITC	Fluorocromo	Compañía
GL7	BD Biosciences	FITC	FITC	BD Biosciences
IgM	Invitrogen	PE	PE	BD Biosciences
IgA	AbD Serotec	PE	PE Cy 7	BD Biosciences
CD138	BD Biosciences	PE	APC	BD Biosciences
Btk	BD Biosciences	PE		
Fas (CD95)	BD Biosciences	PE		
CD45.2	BD Biosciences	PerCP Cy 5.5		
CD19	BD Biosciences	APC		
CD93	eBioscience	APC		

Todos los análisis citométricos se realizaron en un equipo *FACSCanto* (BD Biosciences) con el software *FACSDiva* (BD Biosciences).

Reconstitución hematopoyética por transplante de médula ósea

Para las reconstituciones hematopoyéticas, se usaron como animales receptores ratones CD45.2 C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas letalmente irradiados con dos dosis de 550 cGy separadas entre sí 3 horas.

Como donantes se utilizaron ratones CD45.1 C57BL/6, CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD45.2 CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}. Para ello los animales se sacrificaron por hipoxia en cámara de CO₂ y se extrajeron las tibias y los fémures. La médula ósea se obtuvo por perfusión con RPMI completo a través del conducto medular de estos huesos en condiciones de esterilidad. La suspensión celular obtenida se trató para producir la lisis de eritrocitos como se indicó anteriormente y a continuación se resuspendieron a una concentración de 25×10^6 células/mL en PBS 1X. 5×10^6 células (200 μ L) se inyectaron por vía intravenosa a los ratones receptores 24 horas después de la segunda irradiación (ver **figura 10**, en el apartado Resultados). Las condiciones de transferencia para grupos control y en competición se indican en la **tabla 7**. Desde el momento de la irradiación y hasta el final de experimento los animales transplantados se trataron con 2 mg/mL de neomicina en el agua.

Tabla 7 - Reconstituciones hematopoyéticas

RECEPTORES		DONANTES		
		CD45.1 C57BL/6	CD45.2 CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/+}	CD45.2 CD19-Cre ^{Ki/+} Dicer ^{fl/fl}
CD45.2 C57BL/6 Irradiados letalmente	Grupo A	5×10^6 células	-	-
	Grupo B	-	5×10^6 células	-
	Grupo C	-	-	5×10^6 células
	Grupo D	2.5×10^6 células	2.5×10^6 células	-
	Grupo E	2.5×10^6 células	-	2.5×10^6 células
	Grupo F	-	-	-

Análisis de la expresión de miRNAs en subtipos de células B

Obtención de muestras y extracción de RNA

Bazos de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y D19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} se trataron para la lisis de eritrocitos y se marcaron con anticuerpos como se describió anteriormente y las poblaciones de células B de zona marginal y foliculares se aislaron por citometría de flujo preparativa en un equipo *FACS Aria* (BD Biosciences).

Las extracciones de RNA se realizaron utilizando el reactivo *TRIzol* (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para favorecer la precipitación, se añadió 1 µL de poliacrilamida lineal (*Ambion*) como coprecipitante. Las muestras se conservaron en ultracongelación a -80°C hasta su utilización.

Microarray de miRNAs

Los RNAs obtenidos de las distintas poblaciones se analizaron para comprobar su calidad en un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Todas las muestras utilizadas para las hibridaciones presentaban un índice de integridad de RNA (RIN, del inglés, *RNA Integrity Number*) mayor o igual a 9 (sobre 10).

Las hibridaciones se llevaron a cabo en microarrays de miRNAs de ratón (*Mouse miRNA Microarray Platform*, Agilent). Las intensidades obtenidas en las hibridaciones se normalizaron a la mediana de cada muestra y se transformaron a una escala log₂. Los datos resultantes se analizaron con el *software MultiExperiment Viewer*.

Análisis bioinformático para la predicción de dianas de miRNAs

Los miRNAs seleccionados en base a los resultados de microarray se analizaron para determinar sus posibles dianas en genes importantes en la diferenciación terminal de células B (Aiolos, Btk, CD21 y Notch2). Las predicciones se realizaron usando tres aplicaciones informáticas independientes: *miRanda* (microrna.org), *miRBase* (mirbase.org) y *TargetScan* (targetscan.org).

Cultivos celulares

Cultivo de células empaquetadoras 293T

La línea celular 293T se cultivó en un incubador humidificado estándar (37°C / 5% (v/v) CO₂) en medio DMEM con 4.5 g/L glucosa (*GIBCO*) suplementado con 10% FBS y los antibióticos penicilina (50 U/mL) y estreptomycin (50 µg/mL) (en adelante, DMEM completo).

Cultivo y activación de células B primarias de bazo

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de células B de bazo en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar. Para ello los bazos se disgregaron sobre filtros de nylon de 70 µm de poro en RPMI completo y las suspensiones celulares obtenida se centrifugaron (10' / 400 x g / 4°C). Posteriormente las células se trataron con una solución de cloruro de amonio (*ACK Lysing Buffer, BioWhittaker*) durante cuatro minutos a temperatura ambiente, para producir la lisis de los eritrocitos. Pasado ese tiempo, se realizó un lavado con RPMI completo frío y la suspensión celular se centrifugó de nuevo (10' / 400 x g / 4°C). Después las células se incubaron durante 25 minutos en hielo con una dilución 1:100 en PBS 1X - 1% FBS de un anticuerpo anti-CD43 acoplado a partículas magnéticas (*Miltenyi Biotec*) a una concentración de 10×10^6 células/mL. Posteriormente las células se lavaron y resuspendieron en PBS 1X - 1% FBS. La suspensión celular se hizo pasar por una columna magnética en la que queda retenida la fracción positiva, purificándose las células B (fracción CD43⁻) que se cultivaron en un incubador humidificado estándar, a una concentración de 1.2×10^6 células/mL en RPMI completo con 10 mM Hepes (Invitrogen) y 50 µM β-mercaptoetanol. Las activaciones se realizaron (según se indica para cada experimento) con los siguientes estímulos y concentraciones: 10 ng/mL interleuquina 4 (IL4, *PeprroTech*), 10 µg/mL fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti-IgM (anti-IgM, *Jackson Immunoresearch*) y 25 µg/mL lipopolisacárido (LPS, *Sigma-Aldrich*).

Transducción retroviral de células B primarias

Transfección de células 293T para la obtención de sobrenadantes retrovirales

Construcciones

Para la obtención de sobrenadantes retrovirales las células 293T se cotransfectaron con dos tipos de construcciones distintas: vectores empaquetadores de retrovirus (pCL-ECO) y vectores retrovirales (pMXPIE y pmiRNA). El plásmido pCL-Eco (*Imgenex*) incluye las secuencias codificantes de una cápsida retroviral con tropismo murino, pero carece de una secuencia de encapsidación funcional. Por su parte, los vectores retrovirales utilizados contienen una secuencia de encapsidación (ψ), el gen de interés que se pretende sobreexpresar en células B y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés, *Green Fluorescence Protein*) como reportero.

En el plásmido pMXPIE el promotor MuLV permite la sobreexpresión de un mensajero bicistónico que codifica para las proteínas Btk y GFP gracias a la presencia de una secuencia de unión a ribosoma (IRES, del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*). El vector pMXPIE-Vacío, que se usó como control, carece de la secuencia codificante de Btk pero mantiene la expresión de GFP (**Fig. 27a**).

Por su parte, el plásmido pmiRNA contiene la secuencia de pre-miR185 (pmiRNA-miR185) o pre-miR27a (pmiRNA-miR27a) y sus contextos genómicos respectivos (50 pares de bases en cada extremo del pre-miRNA). La sobreexpresión de los pre-miRNAs se consigue gracias al promotor CMV. Además este vector expresa GFP bajo el control del promotor SV40. De nuevo, en el plásmido pmiRNA-Vacío el gen de GFP y sus secuencias reguladoras se mantienen, pero no codifica ningún pre-miRNA (**Fig. 27b**).

Generación de sobrenadantes retrovirales

Los sobrenadantes retrovirales se obtuvieron por cotransfección transitoria con fosfato cálcico de células empaquetadoras 293T. Para ello se plaquearon 2.5×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. 24 horas después, se preparó el medio de transfección que contiene por cada pocillo a transfectar 90 μ L de agua destilada estéril, 10 μ L de CaCl_2 2.5M, 2 μ g del vector pCL-ECO y 2 μ g del plásmido

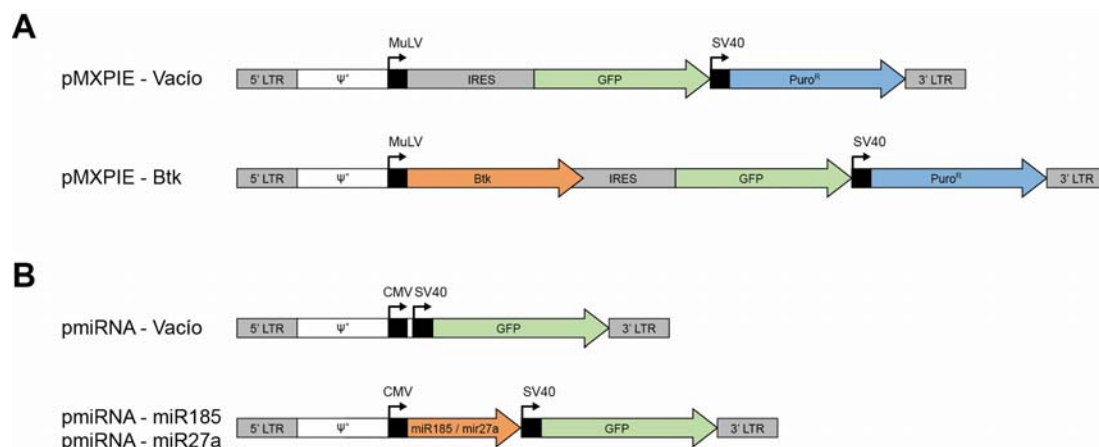


Figura 27 - Esquema de los vectores pMXPIE y pmiRNA

Esquema gráfico de los vectores pMXPIE (A) y pmiRNA (B). pMXPIE contiene el promotor MuLV que permite la sobreexpresión de un mensajero bicistrónico que codifica para las proteínas Btk y GFP (A, pMXPIE-Btk). pmiRNA presenta la secuencia de pre-miR185 (B, pmiRNA-miR185) o pre-miR27a (B, pmiRNA-miR27a) y sus contextos genómicos respectivos (50 pares de bases en cada extremo del pre-miRNA). La sobreexpresión de los pre-miRNAs se consigue gracias al promotor CMV. Este vector expresa también GFP bajo el promotor SV40. Como control negativo en los experimentos de transducción se usaron estos plásmidos sin la región codificante de Btk o de los pre-miRNAs (A, pMXPIE-Vacío y B, pmiRNA-Vacío).

retroviral correspondiente (pMXPIE vacío / Btk o pmiRNA vacío / miR185 / miR27a). Esa mezcla se añadió por goteo sobre 100 μ L de buffer HeBS (0.28 M NaCl₂, 50 μ M Hepes, 1.5 mM Na₂HPO₄) al tiempo que se burbujeaba y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA - fosfato cálcico. Posteriormente se plaqueó la mezcla sobre el cultivo celular por goteo y las células se crecieron durante 16 horas en presencia del medio de transfección. Pasado ese tiempo se sustituyó ese medio por RPMI completo fresco y se mantuvo el cultivo durante 24 horas más, permitiendo así la acumulación de partículas retrovirales. A continuación se recogió el sobrenadante retroviral y se hizo pasar por un filtro de 0.2 μ m para eliminar posibles restos celulares.

Transducción retroviral de células B primarias

Los cultivos de células B primarias se realizaron como se indicó anteriormente y se mantuvieron en condiciones de activación durante 24 horas. Posteriormente el medio de cultivo se sustituyó por el sobrenadante retroviral filtrado, al que se añadió 8 μ g/mL de polibreno (*Sigma-Aldrich*) y los estímulos correspondientes (IL4 / anti-IgM / LPS) según el experimento. Las células se centrifugaron durante dos horas a 1200 x g para favorecer la transducción y se incubaron durante 20 horas en condiciones

estándar. Pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante retroviral, restituyéndose el medio de estimulación.

Análisis de la expresión génica

Análisis de la expresión de RNA mensajero por RT-qPCR

Para el análisis de la expresión de RNA mensajero de Btk y Dicer por RT-qPCR se realizaron extracciones de RNA total de las muestras de interés como se describió anteriormente. Posteriormente 1 µg del RNA obtenido se retrotranscribió a cDNA utilizando hexámeros al azar (*Random Hexamers*, *Applied Biosystems*) como cebadores y la transcriptasa inversa *Superscript II* (*Invitrogen*) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, el cDNA obtenido se utilizó para amplificación por RT-qPCR usando *SYBR green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) y 0.4 mM de las parejas de oligonucleótidos correspondientes para Dicer o Btk. Los resultados obtenidos se normalizaron a los niveles de expresión de GAPDH en cada muestra. En la **tabla 8** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Para el análisis de la expresión de miRNAs maduros se utilizaron kits comerciales *TaqMan MicroRNA Assays* (*Applied Biosystems*). Cada kit contiene oligonucleótidos específicos un miRNA concreto tanto para la reacción de retrotranscripción y como para la RT-qPCR. Para la transcripción inversa se usaron 10 ng de RNA total (extraído según el protocolo descrito anteriormente) y los reactivos del *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*). A continuación, para la RT-qPCR se usaron 2 µL del producto de retrotranscripción y *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). Ambas reacciones se realizaron según el protocolo recomendado por el fabricante.

Todos los ensayos de RT-qPCR se realizaron en un equipo *7900HT Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) y se analizaron con el *software 7900HT Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*).

Tabla 8 - Oligonucleótidos para análisis mediante RT-qPCR

Oligonucleótido		Secuencia
Dicer	Sentido	5' - ACGAAATGCAAGGAATGGACTC - 3'
	Antisentido	5' - GGCACCAGCAAGAGACTCAAA - 3'
Btk	Sentido	5' - AGCGCTCCCAGCAGAAAAA - 3'
	Antisentido	5' - TCTTACTGCCTCTTCTCCACG - 3'
GAPDH	Sentido	5' - TGAAGCAGGCATCTGAGGG - 3'
	Antisentido	5' - CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG - 3'

Análisis de la expresión de proteína por Western Blot

Para determinar los niveles de expresión de la proteína Btk, células B de bazo de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} se aislaron por inmunodepleción magnética con anti-CD43 como se describió anteriormente. Cinco millones de las células obtenidas se lisaron en durante 20 minutos en hielo con buffer de lisis compuesto por 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40 al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron (15' / 16000 x g / 4°C) y se recuperó el lisado proteico que se fraccionó por tamaño por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Para cada muestra se cargaron en el gel el equivalente a 3×10^6 , 1.5×10^6 y 0.75×10^6 células.

Tras la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (*Protran*, *Whatman*) durante una hora a 0.4 A en buffer de transferencia (0.19 M glicina, 25 mM Tris base y 0.01% (v/v) SDS) al que se añadió 20% (v/v) metanol. Después la membrana se bloqueó durante una hora en agitación en PBS 1X con 0.1% (v/v) Tween 20 (en adelante, PBST) al que se añadió 10% (p/v) leche. Después del bloqueo, la membrana se incubó con anticuerpo de conejo anti-Btk de ratón (Abcam) en PBST con 5% BSA durante la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados de cinco minutos con PBST, se incubó durante una hora con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a la peroxidasa HRP (*Dako*) en PBST y se realizaron otros cinco lavados de cinco minutos con PBST.

Para la detección de los anticuerpos unidos a Btk en la membrana se usó el sistema de quimioluminiscencia *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) y se reveló en películas fotosensibles *Hyperfilm ECL* (Amersham).

La cantidad de tubulina presente en cada muestra se usó para normalizar los datos obtenidos para Btk. Para ello la membrana se hibridó durante una hora con anticuerpo de ratón anti-tubulina de ratón (*Sigma-Aldrich*) y a continuación otra hora con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a la peroxidasa HRP (*Dako*), realizándose en cada caso los lavados oportunos con PBST del mismo modo que se describió para Btk. La detección de los anticuerpos unidos a tubulina se realizó con el mismo substrato y películas que se indicaron para la detección de Btk.

Análisis de la expresión de proteína por marcaje intracelular y citometría de flujo

Para determinar los niveles de expresión de Btk en subpoblaciones de células B, los bazo s de los animales de interés se trataron para la lisis de eritrocitos y dos millones de células se utilizaron para hacer un marcaje de membrana con anticuerpos anti-B220, CD21, CD23 y CD93 siguiendo el protocolo descrito con anterioridad. A continuación las células se fijaron en PBS 1X con 2% (p/v) paraformaldehído durante 15 minutos y permeabilizadas con PBS 1X - 1% FBS con 0.05% (v/v) saponina durante 15 minutos. Finalmente, las células se marcaron con anticuerpo anti-Btk conjugado a ficoeritrina durante 30 minutos en hielo en el buffer usado para la permeabilización y se analizaron por citometría de flujo.

Ensayos de activación de células B a través del BCR

Ensayos bioquímicos

Para estudiar la eficiencia de activación a través del BCR de células B CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl}, se determinaron los niveles de fosforilación de la kinasa ERK mediante *western blot*. Para ello células B de bazo se aislaron por inmunodepleción magnética con anti-CD43 como se describió con anterioridad e incubadas durante una hora a 37°C en medio RPMI incompleto (RPMI 1640, 10 mM Hepes y 50 µM β-mercaptoetanol, sin FBS) a una concentración de 30 x 10⁶ células/mL. Pasado ese tiempo, un millón de células se estimularon con 10 µg/mL anti-IgM (*Jackson ImmunoResearch*) durante 1, 5 ó 15 minutos. Como control negativo

se usaron células no estimuladas.

Las células se centrifugaron a los tiempos indicados y se lisaron en hielo durante 30 minutos en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% (v/v) Nonidet P-40, 137.5 mM NaCl y 1% (v/v) glicerol) con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y los inhibidores de fosfatasas NaV y NaF. A continuación se centrifugaron (15' / 16000 x g / 4°C) y se recuperó el sobrenadante. Los lisados se corrieron en gel de poliacrilamida 10% en condiciones reductoras (5% (v/v) β -mercaptoetanol).

Tras la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (*Protran*, *Whatman*) durante dos horas a 0.2 A. La composición del buffer de transferencia es la misma que la indicada anteriormente para el *western blot* de Btk. Una vez transferida, la membrana se bloquearon durante una hora en agitación en PBST con 10% (p/v) leche. Posteriormente, la membrana se hibridó en primer lugar con anticuerpo de conejo anti-ERK fosforilado de ratón (*Cell Signalling*) y, después de revelarlo, se hibridó con anticuerpo de conejo anti-ERK total de ratón (*Biosource*). En ambos casos los anticuerpos se prepararon en PBST con 3% BSA y se incubaron durante una noche. Después de cada hibridación se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBST y la membrana se incubó durante una hora con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a la peroxidasa HRP (*Dako*) en PBST. Por último se realizaron otros cinco lavados de cinco minutos con PBST.

Para la detección de los anticuerpos unidos a ERK fosforilado o ERK total en la membrana se usaron el mismo sistema de quimioluminiscencia y las mismas películas que se describieron para el *western blot* de Btk.

Ensayos *in vitro*

Para los experimentos de activación *in vitro* de linfocitos B a través del BCR, se realizaron cultivos de células CD43⁺ de bazo de ratones CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} como se describió anteriormente y se estimularon con 10 ng/mL IL4 y 10 μ g/mL anti-IgM. Las células se analizaron por citometría de flujo tras 24, 48 y 72 horas en cultivo para determinar su eficiencia de cambio de isotipo a IgG1 y su viabilidad. Para ello se realizó un marcaje de membrana con anticuerpo anti-IgG1 como se indicó anteriormente y a continuación se realizó una tinción con DAPI para discriminar células muertas.

Ensayos de ganancia y pérdida de función de Btk

Los experimentos de ganancia y pérdida de función de Btk se realizaron en cultivos de células B de bazo de ratones C57BL/6 que se prepararon como se describió en apartados anteriores y se estimularon con 10 ng/mL IL4 y 10 µg/mL anti-IgM. Tras 24 horas en cultivo, las células se transdujeron con sobrenadantes retrovirales de los vectores pMXPIE-Btk (sobreexpresión de Btk) y pmiRNA-miR185 (regulación negativa de Btk) y sus correspondientes controles vacíos. 96 horas después de la transducción, las células se marcaron con anticuerpo anti-IgG1 y teñidas con DAPI como marcador de viabilidad. La eficiencia de cambio de isotipo a IgG1 se determinó por citometría de flujo sobre células transducidas GFP⁺.

Repertorio de anticuerpos

Para analizar el repertorio de anticuerpos de animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} se extrajo RNA de células CD43⁺ de bazo y se retrotranscribió a cDNA tal como se describió anteriormente. A continuación el cDNA obtenido se utilizó para amplificar mediante PCR los reordenamientos V(D)J de IgH. La PCR está diseñada de forma que se incluye un oligonucleótido fijo que hibrida con la región constante C_μ y otro oligonucleótido que hibrida con la familia V_H7183 ó V_HJ558 de segmentos V_H (ver esquema en la **figura 28**). Estas dos familias cubren más del 50% de las regiones V_H existentes en ratón. Para la PCR se utilizaron 2 µL de cDNA, 0.2

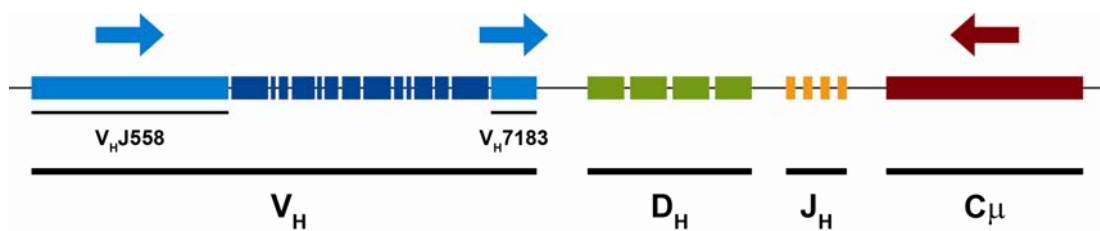


Figura 28 - Esquema de la PCR para el análisis del repertorio de IgH

Esquema gráfico de la PCR de amplificación de reordenamientos V(D)J de IgH. En el extremo 3' los oligonucleótidos diseñados son degenerados de forma que pueden hibridar con distintos elementos de las familias V_HJ558 o V_H7183. En el extremo 5' se cuenta con un solo oligonucleótido que aparea con la cadena constante C_μ. Este sistema permite la amplificación de más del 50% de los reordenamientos V(D)J existentes en ratón.

mM dNTPs, 2.5 U de polimerasa Taq (Roche), buffer con magnesio 1X (Roche), 0.15 μ M del oligonucleótido C μ y 0.15 μ M del oligonucleótido V_H7183 ó V_HJ558. El programa de amplificación fue: 5' - 94°C, 30 x (30'' - 94°C / 30'' - 57°C / 60'' - 72°C), 10' - 72°C. Las secuencias de los oligonucleótidos se indican en la **tabla 9**.

Los productos de PCR se purificaron usando *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), se clonaron en *pGEMT-Easy Vector* (Promega) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se transformaron en bacterias competentes *E. coli DH5a*. La secuenciación se realizó a partir del primer SP6 (presente en pGEMT) y los resultados se analizaron con la aplicación *IgBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

Tabla 9 - Oligonucleótidos para amplificación de reordenamientos de IgH

Oligonucleótido	Secuencia
C μ	5' - ATTTGGGAAGGACTGACTCT - 3'
V _H 7183	5' - GAGTCTGGGGGAGCTTA - 3'
V _H J558	5' - RGCCTGGGRCTTCAGTGAAG - 3' (R = A o G)

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

ELISA de inmunoglobulinas totales

Para determinar los títulos totales de anticuerpo IgM e IgG, se sangraron animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y D19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} en tubos con heparina y se obtuvo el suero centrifugando la sangre a 16000 x g durante 10 minutos. Los sueros se diluyeron en PBS 1X para su utilización. Los análisis se realizaron con los kits comerciales *Mouse IgM ELISA Quantitation Kit* (Bethyl Laboratoires) y *Mouse IgG ELISA Kit* (Roche), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

ELISA de autoanticuerpos anti-dsDNA, ssDNA y cardiolipina

Para la cuantificación de autoanticuerpos capaces de reconocer ssDNA, dsDNA o cardiolipina, se sangraron animales CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+} y D19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/fl} de más de 40 semanas de edad y se obtuvieron los sueros como se indicó en el apartado anterior. Los ELISAs se realizaron en placas *MaxiSorp Immuno plates* (Nunc).

Para la detección de anticuerpos anti-DNA las placas se incubaron con 50 µg/mL de poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*) durante dos horas a 37°C. A continuación se lavaron con agua y se incubaron con 2 µg/mL de DNA de timo de ternero (*Sigma-Aldrich*) en buffer salino (1X PBS, 0.14 M NaCl, 0.01 M NaH₂PO₄) durante la noche a 4°C. Para obtener ssDNA, el DNA de timo de ternero (dsDNA) se hirvió durante 10 minutos y a continuación se enfrió en hielo.

Para la detección de anticuerpos anti-cardiolipina, las placas se incubaron con 20 µg/mL de cardiolipina (*Sigma-Aldrich*) en etanol durante la noche a 4°C.

Posteriormente las placas recubiertas por los antígenos correspondientes se bloquearon con PBS 1X con 4% (p/v) BSA durante una hora y media a temperatura ambiente y se lavaron con PBST. Las diluciones de los sueros se realizaron en PBS 1X con 1% (p/v) BSA y se añadieron a los pocillos, incubando durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron con PBST y se incubaron con anticuerpos anti-IgG (*Roche*) o IgM (*Bethyl Laboratories*) de ratón conjugados a la peroxidasa HRP durante una hora a temperatura ambiente. Por último se añadió el sustrato *ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate* (*Thermo Scientific*) y la densidad óptica se determinó a 425 nm usando un lector de placas convencional.

El suero de ratones MRL^{lpr/lpr} y RAG2^{-/-} se usaron como controles positivos y negativos respectivamente. La capacidad relativa de unión a DNA o cardiolipina se calculó restando a la señal obtenida el fondo de los sueros de RAG2^{-/-} y normalizando a la señal de los sueros MRL^{lpr/lpr}.

Análisis histológicos

Histopatología e inmunohistoquímica

Para el análisis histopatológico de tejidos, bazo y riñones se fijaron con

formalina 10% y embebidos en parafina. En los cortes de bazo se realizaron marcajes inmunohistoquímicos con los anticuerpos anti-Pax5 y anti-CD3e y tinciones hematoxilina-eosina. Los cortes de riñón se tiñeron con plata metenamina (P.A.S.M.).

Detección de inmunocomplejos por inmunofluorescencia

Para la detección de inmunocomplejos se extrajeron riñones de animales de más de 40 semana, se embebieron en OCT (*Tissue Tek*) y se congelaron en nieve carbónica.

Los cortes histológicos se realizaron en un criostato, se fijaron en acetona durante 10 minutos y se lavaron tres veces en PBS 1X durante 5 minutos. A continuación se incubaron con buffer de bloqueo (PBS 1X, 0.3% (p/v) BSA, 0.5% (v/v) Triton, 0.5% (v/v) suero de cabra, 0.5% (v/v) suero de burro y 1% (p/v) gelatina) durante 30 minutos en cámara húmeda y después con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo Alexa 488 (*Invitrogen*) en buffer de bloqueo durante otros 30 minutos. Finalmente los cortes se incubaron durante 10 minutos con Hoechst y se lavaron tres veces en PBS 1X durante 5 minutos.

Los análisis se realizaron en un microscopio confocal *Leica TCS-SP5* (AOBS) usando un objetivo de inmersión de aceite 20X HC PL APO 0.7 N.A. y el *software LAS AF*. A la media de fluorescencia de cada glomérulo se le restó fondo de cada tinción y se normalizó a la media de intensidad observada en los animales control.

Análisis estadísticos

Los resultados de citometría, de RT-qPCR, las densitometrías de *western blot* y las intensidades de fluorescencia de los inmunocomplejos en los glomérulos renales se analizaron con el test t de Student.

Para los análisis de repertorio de anticuerpos se utilizó el test χ^2 .

Para los títulos de autoanticuerpos se estableció un umbral para cada antígeno en base a la media de señal de los animales control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}) más dos desviaciones estándar. Los sueros con señales superiores a ese umbral se consideraron autoreactivos según este criterio y se realizó un test de Fischer.

Para determinar el daño renal se contabilizó el número de glomérulos

afectados por corte y se analizó con un test de Fischer frente a la media de glomérulos afectados en animales control (CD19-Cre^{Ki/+} Dicer^{fl/+}).

Todos los análisis se realizaron con el *software GraphPad*. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

Bibliografía

- Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.E., Sibilia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2009). Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 182, 5088-5097.
- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20, 149-157.
- Attanavanich, K., and Kearney, J.F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 172, 803-811.
- Barbas, S.M., Ditzel, H.J., Salonen, E.M., Yang, W.P., Silverman, G.J., and Burton, D.R. (1995). Human autoantibody recognition of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2529-2533.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217.
- Bloom, D.D., Davignon, J.L., Retter, M.W., Shlomchik, M.J., Pisetsky, D.S., Cohen, P.L., Eisenberg, R.A., and Clarke, S.H. (1993). V region gene analysis of anti-Sm hybridomas from MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol* 150, 1591-1610.
- Bushati, N., and Cohen, S.M. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 175-205.
- Cariappa, A., Chase, C., Liu, H., Russell, P., and Pillai, S. (2007). Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* 109, 2339-2345.
- Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., *et al.* (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* 23, 397-407.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., and Pillai, S. (2001). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603-615.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197, 179-191.
- Carvalho, T.L., Mota-Santos, T., Cumano, A., Demengeot, J., and Vieira, P. (2001). Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med* 194, 1141-1150.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (2001). Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291, 1541-1544.
- Castagnetta, L., Granata, O.M., Traina, A., Cocciadiferro, L., Saetta, A., Stefano, R., Cutolo, M., and Carruba, G. (2002). A role for sex steroids in autoimmune diseases: a working hypothesis and supporting data. *Ann N Y Acad Sci* 966, 193-203.
- Clynes, R., Calvani, N., Croker, B.P., and Richards, H.B. (2005). Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors. *Clin Exp Immunol* 141, 230-237.
- Clynes, R., Dumitru, C., and Ravetch, J.V. (1998). Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 279, 1052-1054.
- Cobb, B.S., Nesterova, T.B., Thompson, E., Hertweck, A., O'Connor, E., Godwin, J., Wilson, C.B., Brockdorff, N., Fisher, A.G., Smale, S.T., and Merkenschlager, M. (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med* 201, 1367-1373.
- Cooper, G.S., and Stroehla, B.C. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2, 119-125.

- Coxon, A., Cullere, X., Knight, S., Sethi, S., Wakelin, M.W., Stavrakis, G., Luscinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2001). Fc gamma RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity* 14, 693-704.
- Crouzier, R., Martin, T., and Pasquali, J.L. (1995). Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol* 154, 4526-4535.
- Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189, 1639-1648.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
- Chong, M.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., and Littman, D.R. (2008). The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* 205, 2005-2017.
- Dai, Y., Huang, Y.S., Tang, M., Lv, T.Y., Hu, C.X., Tan, Y.H., Xu, Z.M., and Yin, Y.B. (2007). Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 16, 939-946.
- Dammers, P.M., Visser, A., Popa, E.R., Nieuwenhuis, P., and Kroese, F.G. (2000). Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected. *J Immunol* 165, 6156-6169.
- de Yebenes, V.G., Belver, L., Pisano, D.G., Gonzalez, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., and Ramiro, A.R. (2008). miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J Exp Med* 205, 2199-2206.
- Dingjan, G.M., Maas, A., Nawijn, M.C., Smit, L., Voerman, J.S., Grosveld, F., and Hendriks, R.W. (1998). Severe B cell deficiency and disrupted splenic architecture in transgenic mice expressing the E41K mutated form of Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 17, 5309-5320.
- Dorner, T., and Burmester, G.R. (2008). New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab. *Curr Opin Rheumatol* 20, 263-268.
- Dorner, T., Jacobi, A.M., and Lipsky, P.E. (2009). B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 11, 247.
- Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.H., Robbani, D.F., Di Virgilio, M., San-Martin, B.R., Heidkamp, G., Schwickert, T.A., *et al.* (2008). MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28, 630-638.
- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., and Pei, G. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 10, 1252-1259.
- Duchosal, M.A., Kofler, R., Balderas, R.S., Aguado, M.T., Dixon, F.J., and Theofilopoulos, A.N. (1989). Genetic diversity of murine rheumatoid factors. *J Immunol* 142, 1737-1742.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981-992.
- Erikson, J., Radic, M.Z., Camper, S.A., Hardy, R.R., Carmack, C., and Weigert, M. (1991). Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* 349, 331-334.
- Fagarasan, S., and Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3, 63-72.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 177, 999-1008.

- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., and et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-682.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681-688.
- Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D., and Diamond, B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 109, 1625-1633.
- Grimaldi, C.M., Hicks, R., and Diamond, B. (2005). B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 174, 1775-1781.
- Halcomb, K.E., Musuka, S., Gutierrez, T., Wright, H.L., and Satterthwaite, A.B. (2008). Btk regulates localization, in vivo activation, and class switching of anti-DNA B cells. *Mol Immunol* 46, 233-241.
- Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* 5, 645-650.
- Hannum, L.G., Ni, D., Haberman, A.M., Weigert, M.G., and Shlomchik, M.J. (1996). A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse: implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease. *J Exp Med* 184, 1269-1278.
- Hao, Z., and Rajewsky, K. (2001). Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J Exp Med* 194, 1151-1164.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173, 1213-1225.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19, 595-621.
- Harfe, B.D., McManus, M.T., Mansfield, J.H., Hornstein, E., and Tabin, C.J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10898-10903.
- Harfst, E., Andersson, J., Grawunder, U., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2005). Homeostatic and functional analysis of mature B cells in lambda5-deficient mice. *Immunol Lett* 101, 173-184.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Honda, M., Herzenberg, L.A., and Steinberg, A.D. (1984). Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2494-2498.
- Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., Pelanda, R., and Reth, M. (2006). Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13789-13794.
- Ichiyoshi, Y., and Casali, P. (1994). Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments. *J Exp Med* 180, 885-895.
- Isenberg, D., and Rahman, A. (2006). Systemic lupus erythematosus--2005 annus mirabilis? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 145-152.
- Ji, H., Gauguier, D., Ohmura, K., Gonzalez, A., Duchatelle, V., Danoy, P., Garchon, H.J., Degott, C., Lathrop, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis. *J Exp Med* 194, 321-330.
- Johnson, S.A., Rozzo, S.J., and Cambier, J.C. (2002). Aging-dependent exclusion of antigen-inexperienced cells from the peripheral B cell repertoire. *J Immunol* 168, 5014-5023.
- Jovanovic, M., and Hengartner, M.O. (2006). miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 25, 6176-6187.

- Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
- Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 172, 969-972.
- Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., and et al. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3, 283-299.
- Klonowski, K.D., and Monestier, M. (2000). Heavy chain revision in MRL mice: a potential mechanism for the development of autoreactive B cell precursors. *J Immunol* 165, 4487-4493.
- Klonowski, K.D., Primiano, L.L., and Monestier, M. (1999). Atypical VH-D-JH rearrangements in newborn autoimmune MRL mice. *J Immunol* 162, 1566-1572.
- Kondo, N., Toyama, T., Sugiura, H., Fujii, Y., and Yamashita, H. (2008). miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 68, 5004-5008.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860-874.
- Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., et al. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10, 451-461.
- Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-822.
- Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39, 673-677.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., and Honjo, T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18, 301-312.
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., and Marshak-Rothstein, A. (2003). Toll-like receptors and activation of autoreactive B cells. *Curr Dir Autoimmun* 6, 105-122.
- Lee, D.M., Friend, D.S., Gurish, M.F., Benoist, C., Mathis, D., and Brenner, M.B. (2002). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 297, 1689-1692.
- Li, Q.J., Chau, J., Ebert, P.J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., et al. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129, 147-161.
- Li, Y., Li, H., and Weigert, M. (2002). Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med* 195, 181-188.
- Liston, A., Lu, L.F., O'Carroll, D., Tarakhovsky, A., and Rudensky, A.Y. (2008). Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 205, 1993-2004.
- Losman, M.J., Fasy, T.M., Novick, K.E., and Monestier, M. (1992). Monoclonal autoantibodies to subnucleosomes from a MRL/Mp(-)/+ mouse. Oligoclonality of the antibody response and recognition of a determinant composed of histones H2A, H2B, and DNA. *J Immunol* 148, 1561-1569.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.L., Taganov, K.D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D., and Rudensky, A.Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914-929.

- Maas, A., Dingjan, G.M., Grosveld, F., and Hendriks, R.W. (1999). Early arrest in B cell development in transgenic mice that express the E41K Bruton's tyrosine kinase mutant under the control of the CD19 promoter region. *J Immunol* 162, 6526-6533.
- Maccioni, M., Zeder-Lutz, G., Huang, H., Ebel, C., Gerber, P., Hergueux, J., Marchal, P., Duchatelle, V., Degott, C., van Regenmortel, M., *et al.* (2002). Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195, 1071-1077.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12, 39-49.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 13, 195-201.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323-335.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617-629.
- Maul, R.W., and Gearhart, P.J. (2010). AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol* 105, 159-191.
- Max, E.E., Seidman, J.G., and Leder, P. (1979). Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3450-3454.
- Mok, C.C., and Lau, C.S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56, 481-490.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6, 283-294.
- Muljo, S.A., Ansel, K.M., Kanellopoulou, C., Livingston, D.M., Rao, A., and Rajewsky, K. (2005). Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 202, 261-269.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.
- Nemazee, D.A., and Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, 562-566.
- Ng, Y.S., Wardemann, H., Chelnis, J., Cunningham-Rundles, C., and Meffre, E. (2004). Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance. *J Exp Med* 200, 927-934.
- Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945-956.
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., and Tarakhovsky, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev* 21, 1999-2004.
- Oberdoerffer, P., Novobrantseva, T.I., and Rajewsky, K. (2003). Expression of a targeted lambda 1 light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements. *J Exp Med* 197, 1165-1172.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162, 7198-7207.

- Otaegui, D., Baranzini, S.E., Armananzas, R., Calvo, B., Munoz-Culla, M., Khankhanian, P., Inza, I., Lozano, J.A., Castillo-Trivino, T., Asensio, A., *et al.* (2009). Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* 4, e6309.
- Pandey, D.P., and Picard, D. (2009). miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 29, 3783-3790.
- Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10, R101.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9, 767-777.
- Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S., and Weigert, M. (1993). B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 177, 1165-1173.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Retter, M.W., and Nemazee, D. (1998). Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med* 188, 1231-1238.
- Rhee, K.J., Jasper, P.J., Sethupathi, P., Shanmugam, M., Lanning, D., and Knight, K.L. (2005). Positive selection of the peripheral B cell repertoire in gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med* 201, 55-62.
- Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-1318.
- Rider, V., and Abdou, N.I. (2001). Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 1, 1009-1024.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., *et al.* (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.
- Rose, N.R. (1998). The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol* 10, 5-13.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., *et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675-685.
- Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., and Tonegawa, S. (1979). Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288-294.
- Samardzic, T., Marinkovic, D., Nielsen, P.J., Nitschke, L., and Wirth, T. (2002). BOB.1/OBF.1 deficiency affects marginal-zone B-cell compartment. *Mol Cell Biol* 22, 8320-8331.
- Satterthwaite, A.B., Cheroutre, H., Khan, W.N., Sideras, P., and Witte, O.N. (1997). Btk dosage determines sensitivity to B cell antigen receptor cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13152-13157.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.
- Schilling, J., Clevinger, B., Davie, J.M., and Hood, L. (1980). Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* 283, 35-40.
- Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol* 8, 665-668.

- Seidman, J.G., Max, E.E., and Leder, P. (1979). A kappa-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature* 280, 370-375.
- Shlomchik, M., Nemazee, D., van Snick, J., and Weigert, M. (1987). Variable region sequences of murine IgM anti-IgG monoclonal autoantibodies (rheumatoid factors). II. Comparison of hybridomas derived by lipopolysaccharide stimulation and secondary protein immunization. *J Exp Med* 165, 970-987.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26, 261-292.
- Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., Guo, Y., Huang, X., Zhou, H., de Vries, N., Tak, P.P., *et al.* (2009). MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60, 1065-1075.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621-629.
- Thai, T.H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., *et al.* (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604-608.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177, 1009-1020.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 172, 973-976.
- Valbuena, O., Marcu, K.B., Weigert, M., and Perry, R.P. (1978). Multiplicity of germline genes specifying a group of related mouse kappa chains with implications for the generation of immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 780-784.
- van Gaalen, F.A., Linn-Rasker, S.P., van Venrooij, W.J., de Jong, B.A., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., Toes, R.E., and Huizinga, T.W. (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 50, 709-715.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., *et al.* (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.
- Vigorito, E., Perks, K.L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P.P., Miska, E.A., Rodriguez, A., Bradley, A., *et al.* (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 27, 847-859.
- Wang, J.H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B.A., and Georgopoulos, K. (1998). Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 9, 543-553.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374-1377.
- Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J., and Hood, L. (1978). Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 785-790.
- Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S.A., Asano, M., Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity* 23, 297-308.
- Whitacre, C.C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2, 777-780.
- Xiao, C., Calado, D.P., Galler, G., Thai, T.H., Patterson, H.C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T.P., and Rajewsky, K. (2007). MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131, 146-159.

Xiao, C., and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136, 26-36.

Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9, 405-414.

Xu, J.L., and Davis, M.M. (2000). Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13, 37-45.

Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P., and Lodish, H.F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7080-7085.

Zhou, X., Jeker, L.T., Fife, B.T., Zhu, S., Anderson, M.S., McManus, M.T., and Bluestone, J.A. (2008). Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 205, 1983-1991.

Anexo

Publicaciones

Belver, L., de Yebenes, V.G., and Ramiro, A.R. (2010). MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*, *in press*.

de Yebenes, V.G., **Belver, L.**, Pisano, D.G., Gonzalez, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., and Ramiro, A.R. (2008). miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J Exp Med* 205, 2199-2206.